

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Pyrostegia venusta*  
MONITORADO POR ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO DE  
MELANÓCITOS *IN VITRO*

CLAUDIO SARZA DE S. FILHO

CURITIBA - PR

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Pyrostegia venusta*  
MONITORADO POR ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO DE  
MELANÓCITOS *IN VITRO*

**CLAUDIO SARZA DE S. FILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, Área de Concentração Química Orgânica, da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Andersson Barison

Co-orientadora: Prof. Dra. Francinete Ramos Campos

CURITIBA - PR

2010

TERMO DE APROVAÇÃO

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE PYROSTEGIA VENUSTA (KER) MIERS E DE  
PROLIFERAÇÃO IN VITRO DE MELANÓCITOS**

por

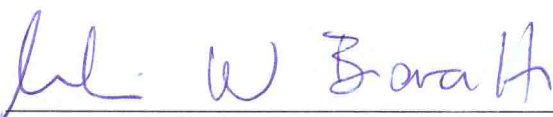
**CLAUDIO SARZA DE SOUZA FILHO**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,  
pela Comissão Examinadora composta por:

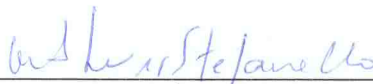
Orientador:



Prof. Dr. Andersson Barison  
Dep. de Química – UFPR



Prof.ª Dr.ª Maique Weber Biavatti  
Dep. de Química - UFSC



Prof.ª Dr.ª Maria Élide Alves Stefanello  
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 16 de dezembro de 2010.

Para minha esposa, Mariana, pelo amor, apoio e paciência.  
Para Nina Maria, que desde que chegou a este mundo encheu minha vida  
de alegria.  
Aos meus pais que sempre apoiaram incondicionalmente meus estudos.



## **AGRADECIMENTOS**

À minha esposa, Mariana que me apoiou com sua compreensão, carinho e amor ao longo deste trabalho.

Aos meus pais, Cláudio e Lourice, importantes referências na minha vida.

Aos meus irmãos, Danielle, Andréa, Adriana e Marcel pelo carinho, admiração e pelos momentos de descontração.

A Jorge e Tina, meus sogros, que sempre foram grandes entusiastas daqueles que se dedicam aos estudos e à pesquisa.

Ao professores Drs. Andersson Barison e Francinete Campos sempre solícitos e acessíveis, verdadeiramente, duas pessoas que se dedicam e amam o que fazem.

Aos colegas do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, Pardal, Carol, Mayara, Aline, Estrela e Angel pela paciência, pelos inúmeros favores e pela ajuda com os experimentos, troca de informações e pelos desabafos.

Aos professores Drs. Daniela Cabrini e Michel Otuki do Laboratório de Inflamação, Dor e Febre do Departamento de Farmacologia desta universidade que orientaram os aspectos farmacológicos deste trabalho. E a colega, deste mesmo laboratório, Cintia Delai que realizou os experimentos farmacológicos.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Carboidratos da UFPR, em especial ao Prof. Dr. Guilherme Sassaki que cedeu a instrumentação necessária para realização de importantes análises deste trabalho e ao demais colegas Lauro, Arquimedes, Tales que me ajudaram nas análises e, além de excelentes pessoas são grandes técnicos.

Ao Grupo Herbarium/Farmoquímica pelo apoio financeiro para realização deste trabalho, especialmente, a Laerte Dall'Agnol e Anny Trentini que deram todo o suporte técnico-gerencial necessário para realização do trabalho.

Aos amigos de Desenvolvimento Analítico do Herbarium: MSc. Gustavo Bertol, MSc. Luzia Franco, Cristiane Mara Kopke, Marina Maciel Braz e Isabela Berhens pela contínua troca de informações e experiências, nós formamos uma bela equipe!!!

Aos demais amigos do Herbarium pela boa convivência e profissionalismo, em especial, aos colegas dos Departamentos de Assuntos

Regulatórios, Controle de Qualidade físico-químico e Desenvolvimento de Produtos.

Ao Prof. Dr. Alfredo Marques, DQ-UFPR, pela colaboração com o treinamento no software do HLPC e pelas produtivas discussões a respeito de química e do meu trabalho.

Ao Dr. Antônio Carpanezi do Embrapa Florestas que orientou a coleta do material botânico.

Ao Prof. Dr. José Augusto Villar da UFSJ que em um momento crucial deste trabalho me mostrou o caminho das pedras.

Enfim, obrigado Deus por ter me dado a oportunidade de conviver com todas essas pessoas.

Todas as grandes coisas são simples. E muitas podem ser expressas numa só palavra: liberdade; justiça; honra; dever; piedade; esperança.

Winston Churchill

## RESUMO

As estratégias terapêuticas para o tratamento de vitiligo têm em comum o fato de que nenhuma delas atinge a eficácia terapêutica desejada, o que evidencia a necessidade novas pesquisas em busca de novas abordagens terapêuticas, incluindo os fitoterápicos. *Pyrostegia venusta* é uma trepadeira lenhosa com expressiva dispersão em quase todo o Brasil, especialmente na região sul. Esta espécie é popularmente conhecida como cipó de São João. Na medicina popular, suas flores são empregadas no tratamento tópico de leucodermas e vitiligo, enquanto suas folhas e talos são utilizados no tratamento de diarreias e desinteria. Poucos estudos fitoquímicos de *P. venusta* foram publicados e nenhum manuscrito, que investigasse as potenciais propriedades farmacológicas da planta no tratamento de vitiligo, foi publicado até a presente data. A turbólise foi a técnica de extração empregada na preparação das tinturas de *P. venusta*. As partes de *P. venusta* que apresentaram atividade farmacológica, flores e folhas, foram fracionadas, a partir das respectivas tinturas, primeiramente em coluna de adsorção em sílica sob vácuo. Deste fracionamento, foram obtidas quatro frações: hexânica, acetato de etila, etanólica e metanólica. A fração acetato de etila foi analisada por CG-EM com objetivo de identificar compostos. A CLAE foi utilizada como técnica analítica para a separação e isolamento dos compostos presentes nas frações polares de flores e folhas de *P. venusta*. Da fração etanólica das flores de *P. venusta*, foram isolados e caracterizados os compostos fenólicos (verbascosídeo, rutina, isoquercetrina e nicotiflorina) e heterocíclico (alantoína). Da fração metanólica das folhas de *P. venusta*, foram isolados e caracterizados os compostos rutina e alantoína e da fração metanólica das raízes de *P. venusta*, foram isolados e caracterizados o verbascosídeo e a alantoína. Por meio da análise por CG-EM, das frações acetato de etila de flores, folhas e raízes de *P. venusta*, foram identificados de cinco fitoesteróis ( $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, estigmastanol, campesterol e colesterol), 16 ácidos graxos saturados e monoinsaturados e o fitol. No que diz respeito aos ensaios farmacológicos, extratos brutos de flores e folhas, obtidos por turbólise, foram as partes da *P. venusta* que apresentaram atividade farmacológica no ensaio de produção espontânea de melanina *in vitro*. O resultado do ensaio de atividade da enzima tirosinase para as folhas de *P. venusta*, indicou uma via (ou mecanismo de ação) através da qual acontece o aumento da produção espontânea de melanina. Os resultados dos ensaios farmacológicos das flores e folhas, em particular aqueles de produção de melanina *in vitro*, são inéditos e promissores para investigações farmacológicas posteriores, além de corroborarem a utilização das flores na medicina popular. Além disso, estes resultados preliminares sugerem a necessidade de estudos farmacológicos mais aprofundados no sentido de elucidar mecanismos de ação dos compostos isolados e investigar a eficiência de preparações padronizadas no tratamento de vitiligo.

Palavras-chave: *Pyrostegia venusta*. Bignoniaceae. CLAE. Verbascosídeo. vitiligo

## ABSTRACT

The therapeutic approaches used for vitiligo treatment has insufficient efficacy, regarding the emergency for new researches in order to find more effective treatments, including phytomedicines strategies. In this way, *Pyrostegia venusta* is a tendril bearing evergreen climber widespread in Brazil, especially in southern, popularly known as cipó de São João. In folk medicine, its flowers are employed for the treatment of leucoderm and vitiligo, while its leaves and stems are used in the treatment of diarrhea. However, until the present few phytochemical investigations have been performed on *P. venusta* and none pharmacological studies about its therapeutical properties for treatment of skin diseases. In this work, turbolysis shows to be the best form for extraction the metabolites of *P. venusta* and flowers and leaves showed to have biological activities and therefore were submitted to compound isolation by chromatographic techniques, mainly by preparative HPLC, while non polar extracts were analyzed by GC-MS. In this way, purification of ethanolic extract of flowers yielded verbascoside, rutin, isoquercetin, nicotiflorin and allantoin. Fractionation of methanolic extract of leaves resulted in rutin and allantoin and from methanolic fraction of roots verbascoside and allantoin. The GC-MS analysis of ethyl acetate fractions of flowers, leaves and roots afforded to identification of  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, estigmastanol, campesterol and cholesterol and 16 saturated and monosaturated fatty acids as well as phytol. Extracts of flowers and leaves, obtained by turbolysis, were able to stimulate the spontaneous melanin production *in vitro*, which are in full accordance with the folk medicine. Tyrosinase activity assays of leaves showed an improvement of melanin production in the melanocyte cells. All this founds shows the needs for more investigations mainly about the flowers of *P. venusta* in order to find the active compounds as well as to elucidate the mechanism of action regarding to get standardized extracts of *P. venusta* for vitiligo treatment.

**Keywords:** *Pyrostegia venusta*. Bignoniaceae. HPLC. Verbascoside. Vitiligo.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FLORAÇÃO DE <i>PYROSTEGIA VENUSTA</i> .....	10
FIGURA 2 – ROTOR E O APARATO EXPERIMENTAL DA EXTRAÇÃO TURBO .....	15
FIGURA 3 – FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DAS TINTURAS DE <i>P. VENUSTA</i> , EM ESCALA LABORATORIAL .....	17
FIGURA 4 – FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DE <i>P. VENUSTA</i> EM ESCALA PILOTO VIA TURBÓLISE E FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS .....	18
FIGURA 5 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE <sup>1</sup> H DOS EXTRATOS DAS FLORES DE <i>P. VENUSTA</i> MD-1 (VERMELHO) E T-1 (AZUL). ....	34
FIGURA 6 – ANÁLISE POR CCD DOS PADRÕES DE FITOESTERÓIS E TINTURAS DE <i>P.</i> <i>VENUSTA</i> . ....	35
FIGURA 7 – ANÁLISE POR CCD DOS PADRÕES DE FLAVONÓIDES E TINTURAS T-1 A T-4. ....	36
FIGURA 8 – ANÁLISE POR CCD DOS PADRÕES DE TRITERPENOS E TINTURAS T-1 A T-4. ....	37
FIGURA 9 – ANÁLISE POR CCD DO PADRÃO DE ALANTOÍNA E TINTURAS T-1 A T-4.....	38
FIGURA 10 – EFEITO DOS EXTRATOS DE <i>P. VENUSTA</i> SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA TIROSINASE. ....	39
FIGURA 11 – AÇÃO DO EXTRATO (T-1) DAS FLORES DE <i>P. VENUSTA</i> SOBRE A PRODUÇÃO DE MELANINA EM MELANÓCITOS B16F10 .....	41
FIGURA 12 – AÇÃO DO EXTRATO DAS FLORES DE <i>P. VENUSTA</i> NA VIABILIDADE DE MELANÓCITOS PELO ENSAIO DO MTT.....	42
FIGURA 13 – AÇÃO DO EXTRATO (T-2) DAS FOLHAS DE <i>P. VENUSTA</i> SOBRE A PRODUÇÃO DE MELANINA EM MELANÓCITOS B16F10. ....	43
FIGURA 14 – AÇÃO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE <i>P. VENUSTA</i> (T-2) NA VIABILIDADE DE MELANÓCITOS PELO ENSAIO DO MTT.....	43
FIGURA 15 – AÇÃO DOS EXTRATOS (T-3) DOS TALOS E T-4 DAS RAÍZES DE <i>P.</i> <i>VENUSTA</i> SOBRE A PRODUÇÃO DE MELANINA EM MELANÓCITOS B16F10 .....	44
FIGURA 16 – AÇÃO DOS EXTRATOS DOS TALOS E RAÍZES DE <i>P. VENUSTA</i> , T-3 E T-4, RESPECTIVAMENTE, NA VIABILIDADE DE MELANÓCITOS PELO ENSAIO DO MTT.....	45
FIGURA 17 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA SUBFRAÇÃO ETANÓLICA DE FLORES DE <i>P.</i> <i>VENUSTA</i> COM 0,1% TFA EM ÁGUA E ACN COMO FASE MÓVEL E DETECÇÃO A 370 NM .....	48
FIGURA 18 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA SUBFRAÇÃO ETANÓLICA DE FLORES DE <i>P.</i> <i>VENUSTA</i> COM FASE MÓVEL 0,5% ÁCIDO FOSFÓRICO E METANOL E DETECÇÃO A 330 NM .....	49
FIGURA 19 – CROMATOGRAMAS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DA FRAÇÃO ETANÓLICA DAS FLORES (FLETOH) COM DETECÇÃO A 330 NM.....	50
FIGURA 20 – COMPARAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO EM COLUNAS C <sub>18</sub> DE DIFERENTES FABRICANTES PARA SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM FLETOH COM DETECÇÃO A 330 NM .....	51

FIGURA 21 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS RMN DE $^1\text{H}$ DAS FRAÇÕES ETANÓLICA (AZUL) E METANÓLICA (VERMELHO) DAS FLORES DE <i>P. VENUSTA</i> .	52
FIGURA 22 – SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS ADQUIRIDOS A 330 NM, DAS FRAÇÕES ETANÓLICA (VERMELHO) E METANÓLICA (VERDE) DAS FOLHAS DE <i>P. VENUSTA</i> .	53
FIGURA 23 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS RMN DE $^1\text{H}$ DAS FRAÇÕES ETANÓLICA (AZUL) E METANÓLICA 90% (VERMELHO) DAS RAÍZES DE <i>P. VENUSTA</i> .	54
FIGURA 24 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE DE FLETOH E OS ESPECTROS DE UV DOS COMPOSTOS ISOLADOS	56
FIGURA 25 – CROMATOGRAMA (ACIMA) OBTIDO POR CLAE DE FOMEHO E ESPECTRO DE UV-VIS (ABAIXO) DO COMPOSTO ISOLADO	57
FIGURA 26 – ESPECTRO DE RMN $^1\text{H}$ DE VERBASCOSÍDEO (MEOD, 400 MHZ)	59
FIGURA 27 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$ (HSQC) DA FRAÇÃO ETANÓLICA DAS FLORES DE <i>P. VENUSTA</i> .	60
FIGURA 28 – MAPA DE CORRELAÇÃO $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$ A LONGA DISTÂNCIA (HMBC) DA FRAÇÃO ETANÓLICA DAS FLORES DE <i>P. VENUSTA</i> .	61
FIGURA 29 – ESPECTROS DE RMN DE $^1\text{H}$ DE FLETOH-12 (AZUL) E PADRÃO DE ROTINA (VERMELHO)	63
FIGURA 30 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO FLETOH-12.	64
FIGURA 31 – MAPA DE CORRELAÇÃO $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$ A LONGA DISTÂNCIA DA FRAÇÃO FLETOH-12	65
FIGURA 32 – ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DE FLETOH-13	67
FIGURA 33 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$ DE FLETOH-13	68
FIGURA 34 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$ DE FLETOH-13	69
FIGURA 35 – REPRESENTAÇÃO DA QUEBRA DA LIGAÇÃO GLICOSÍDICA E POSTERIOR FORMAÇÃO DO FRAGMENTO $M/Z$ 301.	71
FIGURA 36 – ESPECTRO DE ESI(+)-EM DO COMPOSTO FLETOH-13.	71
FIGURA 37 – ESPECTRO DE ESI(+)-EM/EM DO ION DE $M/Z$ 487,2 $[M+NA]^+$	72
FIGURA 38 – ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DA FRAÇÃO FLETOH-14.	73
FIGURA 39 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO FLETOH-14.	74
FIGURA 40 – MAPA DE CORRELAÇÃO $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$ A LONGA DISTÂNCIA DA FRAÇÃO FLETOH-14.	75
FIGURA 41 – ESPECTRO DE ESI(+)-EM DO COMPOSTO FLETOH-14.	77
FIGURA 42 – ESPECTRO DE ESI(+)-EM/EM DO ION DE $M/Z$ 617,1 $[M+NA]^+$	77
FIGURA 43 – ESPECTROS DE RMN DE $^1\text{H}$ DE FOMEHO-9 (AZUL) E PADRÃO DE ROTINA (VERMELHO)	78
FIGURA 44 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$ DE FLETOH.	79
FIGURA 45 – MAPA DE CORRELAÇÃO $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$ A LONGA DISTÂNCIA DE FLETOH.	80
FIGURA 46 – CROMATOGRAMAS DO EXTRATO BRUTO DAS FLORES DE <i>P. VENUSTA</i> SEM CLEAN UP	82

FIGURA 47 – CROMATOGRAMA DE EXTRATO BRUTO DAS FLORES APÓS PURIFICAÇÃO COM SPE COM COMPRIMENTO DE ONDE DE 220 NM (A) E ESPECTRO DE UV DO PICO EM 6,220 MINUTOS (B).....	83
FIGURA 48 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS APÓS PURIFICAÇÃO COM SPE: PICO ALANTOÍNA EM 6,814 MINUTOS COM COMPRIMENTO DE ONDE DE 220 NM (A) E CROMATOGRAMA DE EXTRATO BRUTO RAÍZES APÓS PURIFICAÇÃO COM SPE: PICO ALANTOÍNA EM 6,33 MINUTOS COM COMPRIMENTO DE ONDE DE 220 NM (B). ....	84
FIGURA 49 – ESPECTRO DE <sup>1</sup> H DO PADRÃO DE β-SITOSTEROL (A); ESPECTRO DE <sup>1</sup> H DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FLORES (B) E ESPECTRO DE <sup>1</sup> H DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE RAÍZES (C).....	86
FIGURA 50 – CROMATOGRAMAS DAS FRAÇÕES ACETATO DE ETILA DAS FLORES, RAÍZES E FOLHAS DE <i>P. VENUSTA</i> ADQUIRIDO NO SISTEMA GC-DIC. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: 200°C POR 3 MINUTOS E RAMPA DE 10°C POR MINUTOS ATÉ 300°C DE 3 ATÉ 35 MINUTOS. INJETOR E DETECTOR A 325°C. COLUNA CROMATOGRÁFICA: DB-1 DE 30 M X 250 μM E 0,25 μM DE ESPESSURA DO FILME. ....	88
FIGURA 51 – CROMATOGRAMA (TIC) DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FLORES DE <i>P. VENUSTA</i> . CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: 100°C POR 3 MINUTOS E RAMPA DE 10°C POR MINUTOS ATÉ 280°C DE 3 ATÉ 20 MINUTOS. INJETOR A 300°C. COLUNA CROMATOGRÁFICA: DB-1 DE 30 M X 250 μM E 0,25 μM DE ESPESSURA DO FILME. DETECTOR SELETIVO DE MASSAS COM IMPACTO ELETRONICO (70EV) E AS TEMPERATURAS DO QUADRUPOLO E FONTE DE IONIZAÇÃO IGUAIS A 150°C E 280°C.....	89
FIGURA 52 – CROMATOGRAMA (TIC) DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE <i>P. VENUSTA</i> . CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: 100°C POR 3 MINUTOS E RAMPA DE 10°C POR MINUTOS ATÉ 280°C DE 3 ATÉ 20 MINUTOS. INJETOR A 300°C. COLUNA CROMATOGRÁFICA: DB-1 DE 30 M X 250 μM E 0,25 μM DE ESPESSURA DO FILME. DETECTOR SELETIVO DE MASSAS COM IMPACTO ELETRONICO (70EV) E AS TEMPERATURAS DO QUADRUPOLO E FONTE DE IONIZAÇÃO IGUAIS A 150°C E 280°C.....	92
FIGURA 53 – CROMATOGRAMA (TIC) DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS RAÍZES DE <i>P. VENUSTA</i> . CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: 100°C POR 3 MINUTOS E RAMPA DE 10°C POR MINUTOS ATÉ 280°C DE 3 ATÉ 20 MINUTOS. INJETOR A 300°C. COLUNA CROMATOGRÁFICA: DB-1 DE 30 M X 250 μM E 0,25 μM DE ESPESSURA DO FILME. DETECTOR SELETIVO DE MASSAS COM IMPACTO ELETRONICO (70EV) E AS TEMPERATURAS DO QUADRUPOLO E FONTE DE IONIZAÇÃO IGUAIS A 150°C E 280°C.....	95
FIGURA 54 – COMPOSTOS IDENTIFICADOS NAS FRAÇÕES ACETATO DE ETILA DAS FLORES, FOLHAS E RAÍZES DE <i>P. VENUSTA</i> . ....	99



## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – QUANTIDADES DO MATERIAL BOTÂNICO OBTIDAS APÓS MOAGEM.....	15
QUADRO 2 – IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	19

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – RESÍDUO SECO DOS EXTRATOS OBTIDOS POR TURBÓLISE (T) E MACERAÇÃO DINÂMICA (MD). .....	33
TABELA 3 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DA CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO EM COLUNA.....	45
TABELA 4 – DADOS DE RMN DO COMPOSTO FLETOH-9 E VERBASCOSÍDEO*. .....	62
TABELA 5 - DADOS DE RMN DO COMPOSTO FLETOH-12 E RUTINA*. .....	66
TABELA 6 - DADOS DE RMN DO COMPOSTO FLETOH-13 E ISOQUERCITRINA*. .....	70
TABELA 8 – DADOS DE RMN DE $^1\text{H}$ E $^{13}\text{C}$ PARA P-1 E ALANTOÍNA NA FRAÇÃO FLETOH. ...	81
TABELA 9 – COMPOSTOS NA FORMA DE ÉSTERES TRIMETILSILILADOS, IDENTIFICADOS NA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FLORES DE <i>P. VENUSTA</i> .....	90
TABELA 10 – ÍON MOLECULAR, PRINCIPAIS ÍONS FRAGMENTOS E CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NAS FLORES.....	91
TABELA 11 – COMPOSTOS NA FORMA DE ÉSTERES TRIMETILSILILADOS, IDENTIFICADOS NA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE <i>P. VENUSTA</i> .....	93
TABELA 13 – COMPOSTOS NA FORMA DE ÉSTERES TRIMETILSILILADOS, IDENTIFICADOS NA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS RAÍZES DE <i>P. VENUSTA</i> .....	96

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	- Acetonitrila
BSTFA	- N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoracetamida
CCD	- Cromatografia em Camada Delgada
CG-DIC	- Cromatografia a gás com Detector de Ionização em Chama
CG-EM	- Cromatografia a gás-Espectrometria de Massas
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM	- Cromatografia líquida de alta eficiência-Espectrometria de Massas
DMF	- Dimetilformamida
DPR	- Desvio padrão relativo
EM	- Espectrometria de massas
ESI	- electrospray
eV	- Elétrons-volt
HMBC	- Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	- Heteronuclear Single Quantum Coherence
min	- Minutos
$m/z$	- Relação massa-carga
RMN de $^{13}\text{C}$	- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de $^1\text{H}$	- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
rpm	- Rotações por minuto
s	- Segundos
SPE	- Solid Phase Extraction
TFA	- Ácido Trifluoroacético
THF	- Tetrahidrofurano
TMS	- Tetrametilsilano
TMSC	- Clorotrimetilsilano
u.m.a.	- Unidade de massa atômica
USP	- United States Pharmacopeia
UVA	- Radiação ultra-violeta de banda larga
UVB	- Radiação ultra-violeta de banda estreita

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>3</b>
1.1	CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA .....	3
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>5</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	5
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	5
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>5</b>
3.1	VITILIGO, MELANOGÊNESE E PLANTAS MEDICINAIS NO TRATAMENTO DA DOENÇA .....	5
3.2	DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE, INVESTIGAÇÕES FITOQUÍMICAS E FARMACOLÓGICAS .....	9
3.3	TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE TINTURAS .....	13
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
4.1	MATERIAL BOTÂNICO DE <i>P. VENUSTA</i> .....	15
4.2	EXTRAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	16
4.2.1	Obtenção das tinturas via Turbólise e Maceração Dinâmica em escala laboratorial .....	16
4.2.2	Obtenção dos extratos brutos via extração turbo em escala piloto .....	17
4.3	MÉTODOS DE ANÁLISE PARA COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO .....	19
4.3.1	Análise de Resíduo Seco .....	19
4.3.2	Análise de polifenóis totais .....	20
4.3.2.1	Preparo das amostras das tinturas MD-1 a MD-4 e T-1 a T-4.....	20
4.3.2.2	Preparo da solução padrão de ácido pirogálico .....	20
4.3.3	Análise por cromatografia em camada delgada - CCD .....	21
4.3.3.1	Deteção de flavonóides por CCD .....	21
4.3.3.2	CCD de triterpenos.....	21
4.3.3.3	Deteção de fitoesteróis por CCD .....	22
4.3.3.4	Deteção de alantoína por CCD .....	22
4.3.3.5	Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H.....	23
4.4	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	23
4.4.1	Análise dos compostos fenólicos por CLAE.....	23
4.4.1.1	Condições cromatográficas das análises em escala analítica.....	24
4.4.1.2	Condições cromatográficas das análises em escala semi-preparativa .....	24
4.4.2	Análise de Alantoína por CLAE .....	25
4.4.2.1	Condições cromatográficas.....	25
4.4.2.2	Preparo das amostras de extratos brutos liofilizados .....	25
4.4.2.3	Preparo das amostras de tinturas .....	26
4.4.2.4	Fortificação das amostras com solução padrão de alantoína.....	26
4.4.2.5	Pré-purificação das amostras de tinturas e extratos brutos por SPE para análise de alantoína por CLAE .....	26
4.5	ANÁLISES DAS FRAÇÕES ACETATO DE ETILA POR CG .....	27
4.5.1	Condições cromatográficas das análises por CG-DIC.....	27
4.5.2	Preparo dos padrões de fitoesteróis.....	27

4.5.3 Preparo das amostras .....	27
4.5.4 Condições cromatográficas das análises por CG-EM.....	28
4.6 ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR CLAE SEMI- PREPARATIVA .....	28
4.6.1 Condições cromatográficas das análises IES-EM .....	28
4.6.2 Preparo das amostras .....	29
4.7 ENSAIOS IN VITRO .....	30
4.7.1 Ensaio de atividade da enzima tirosinase .....	30
4.7.2 Ensaio de produção espontânea de melanina .....	30
4.7.2.1 Preparo da cultura de células de melanoma.....	30
4.7.2.2 Determinação do conteúdo de melanina nos melanócitos .....	31
4.7.3 Ensaio de viabilidade celular pelo método do tetrazolium (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium (MTT)).....	31
4.7.4 Análise estatística.....	31
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>32</b>
5.1 AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS OBTIDOS EM ESCALA LABORATORIAL VIA EXTRATOR TURBO E MACERAÇÃO DINÂMICA.....	32
5.1.1 Análise de resíduo seco .....	32
5.1.2 Análise espectrofotométrica UV-VIS de polifenóis totais .....	33
5.1.3 Análise por RMN de <sup>1</sup> H.....	33
5.1.4 Análise por CCD .....	35
5.2 ENSAIOS IN VITRO .....	38
5.2.1 Ensaio de atividade sobre a enzima tirosinase .....	38
5.2.2 Ensaios de produção espontânea de Melanina e de viabilidade celular pelo método MTT. ....	40
5.3 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS DE <i>P. VENUSTA</i> .....	45
5.3.1 Purificação dos extratos brutos (T-1, T-2 e T-4) .....	45
5.3.2 ANÁLISES DAS FRAÇÕES ETANÓLICA E METANÓLICA POR RMN.....	46
5.3.3 Análises por CLAE das frações polares de flores, folhas e raízes .....	47
5.3.3.1 Desenvolvimento do método analítico para identificação e separação dos compostos fenólicos das flores, folhas e raízes de <i>P. venusta</i> .....	47
5.3.3.2 Escolha das frações polares de flores, folhas e raízes que foram fracionadas por CLAE semi- preparativa.....	52
5.3.3.3 Transferência do método analítico para a escala semi-preparativa .....	54
5.3.3.4 Fracionamento dos compostos presentes nas frações polares de flores e folhas de <i>P. venusta</i> por CLAE semi-preparativa .....	56
5.3.4 Caracterização dos compostos majoritários da fração etanólica das flores .....	58
5.3.4.1 Elucidação estrutural de Verbascosídeo.....	58
5.3.4.2 Elucidação estrutural de Rutina .....	63
5.3.4.3 Elucidação estrutural de Isoquercitrina .....	67
5.3.4.4 Elucidação estrutural de Nicotiflorina.....	72

5.3.5 Caracterização do composto majoritário Rutina da fração metanólica das folhas de <i>P. venusta</i> .....	78
5.4 CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO COMPOSTO P-1 .....	79
5.5 ANÁLISES DAS FRAÇÕES ACETATO DE ETILA DE FLORES, FOLHAS E RAÍZES.....	85
5.5.1 Espectros de RMN de <sup>1</sup> H das frações acetato de etila de flores e raízes .....	85
5.5.2 Análises por CG-DIC das frações acetato de etila de flores, folhas e raízes .....	87
5.5.3 Análises por CG-EM das frações acetato de etila de flores, folhas e raízes .....	88
5.5.3.1 Compostos identificados nas flores de <i>P. venusta</i> .....	88
5.5.3.2 Compostos identificados nas folhas de <i>P. venusta</i> .....	92
5.5.3.3 Compostos identificados nas raízes de <i>P. venusta</i> .....	95
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>100</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>102</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

O vitiligo é uma doença que ocorre com frequência significativa, afetando cerca de 0,5 a 4 % da população mundial e permanece ainda com a causa precisa desconhecida, podendo ocorrer com a participação de fatores genéticos, imunológicos e neurais na sua etiopatogenia (REYES *et al.*, 1996). Essa enfermidade apresenta-se também associada à falta de melanina, substância dependente da presença de melanócitos funcionais nos seres humanos. O tratamento tradicional do vitiligo inclui a foto-quimioterapia com agentes psoralênicos (5-metoxipsoraleno e 8-metoxipsoraleno), seguido da fototerapia através da exposição à radiação UVA, também denominado de PUVA (Psoralens plus UVA), assim como, corticóides sistêmicos e múltiplos procedimentos cirúrgicos (KOVACS, 1998). Enquanto, as opções terapêuticas mais modernas incluem: o uso de imunomoduladores tópicos (tacrolimus e pimecrolimus), análogos da vitamina D<sub>3</sub> e L-fenilalanina (SAMPAIO *et al.*, 2001); fototerapia com radiação UVB de banda estreita ou ainda a combinação de diferentes abordagens terapêuticas, como por exemplo, análogos da vitamina D e radiação UVB; Laser Excimer no comprimento de onda de 308 nm e tacrolimus (GAWKRODGER *et al.*, 2008; NICOLAIDOU *et al.*, 2009). Entretanto, nenhum destes agentes atinge a eficácia desejada na promoção da repigmentação das áreas lesadas da pele (NJOO *et al.*, 1999), o que justifica a busca por novas alternativas para o tratamento de vitiligo.

Por outro lado, as plantas medicinais são ricas em compostos que possuem as mais diversas atividades biológicas e representam uma estratégia interessante na triagem de agentes com potencial repigmentante para o tratamento do vitiligo. Um exemplo é a planta *Brosimum gaudichaudii* utilizada na medicina popular para o combate do vitiligo, sendo a partir desta desenvolvido o medicamento Viticromin®, indicado para o tratamento de vitiligo e discromias (LEÃO, 2005).

Neste contexto, preparações das flores de *Pyrostegia venusta*, são empregadas na medicina popular para o tratamento tópico de manchas brancas

no corpo, como leucodermas e vitiligo (LORENZI, 1982). As folhas e caules são empregados como tônico e no tratamento de diarreia e disenteria (LORENZI, 1982; MARTINS *et al.*, 2003). Demonstrando assim que a espécie possui grande potencial para ser investigada quimicamente visando obter princípios ativos para o tratamento do vitiligo.

Segundo LAPA *et al.* (2000), o uso popular de plantas medicinais não é suficiente para validá-las como medicamentos eficazes e seguros, pois estas não se diferenciam de qualquer outro xenobiótico sintético, assim a preconização ou autorização oficial do seu uso como medicamento devem estar fundamentadas em evidências experimentais a partir de estudos fitoquímicos, de eficácia e segurança. Neste sentido, o Ministério da Saúde aprovou a Portaria nº 971, de 03/05/2006 - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares - PNPIC no Sistema Único de Saúde - SUS, que recomenda e incentiva a adoção de fitoterápicos no tratamento de diversas moléstias.

Os fitoterápicos são responsáveis por 2,5% do mercado total de medicamentos no Brasil, e vem crescendo em torno de 12% ao ano. Complementando esta Política, o governo brasileiro através do Decreto Nº 5.813, de 22/06/2006, instituiu a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos com o objetivo de garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional. Finalmente, a Portaria 2960 de 09/12/2008, aprovou o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e criou o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Posteriormente, foi publicada a RDC nº14 de 31 de março de 2010 que dispõe sobre os requisitos mínimos para o registro de medicamentos fitoterápicos.

Considerando que *Pyrostegia venusta* é uma planta usada na medicina popular para o tratamento tópico de manchas brancas no corpo (leucodermas e vitiligo), torna-se importante investigar sua composição química, bem como suas propriedades farmacológicas, com o objetivo de identificar seus princípios ativos, de modo a contribuir para o desenvolvimento de um fitoterápico eficaz e seguro para o tratamento de vitiligo. Neste sentido, o Departamento de Química juntamente com o Departamento de Farmacologia da UFPR em parceria com a empresa Herbarium Laboratório Botânico têm como objetivo o estudo fitoquímico

de *Pyrostegia venusta* monitorado por ensaios de proliferação de melanócitos *in vitro*.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar a composição química e a atividade farmacológica de *Pyrostegia venusta* visando identificar seus princípios ativos através de ensaios de proliferação de melanócitos *in vitro*.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Preparar extratos e tinturas de folhas, flores, talos e raízes da planta;
- Testar a atividade farmacológica dos extratos brutos de folhas, talos, flores e raízes;
- Fracionar e isolar os metabólitos secundários dos extratos ativos;
- Identificar os metabólitos secundários através de técnicas cromatográficas e espectroscópicas, tais como, cromatografia em coluna de sílica e de alta eficiência, Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas (CLAE-EM e CG-EM).

## **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1 VITILIGO, MELANOGÊNESE E PLANTAS MEDICINAIS NO TRATAMENTO DA DOENÇA**

O vitiligo é uma doença de etiologia desconhecida e que afeta o mecanismo de pigmentação da pele. A patologia da doença não é completamente entendida e pode incluir além de disfunção imune, mecanismos neurais e



genéticos, estresse oxidativo ou bioquímico. Esta doença ocorre em todas as etnias e os picos da doença aparecem entre a segunda e terceira décadas de vida (PARAVAR & LEE, 2010).

As máculas brancas do vitiligo são causadas pela perda de funcionalidade dos melanócitos da epiderme. A biossíntese de melanina consiste em uma complexa cascata de reações que acontecem em células altamente especializadas chamadas melanócitos, as quais encontram-se dentro de organelas chamadas de melanossomas (JANG *et al.*, 2008). Três enzimas melanócito-específicas, tirosinase, proteína tirosinase relacionada 1 (TRP-1) e proteína tirosinase relacionada 2 (TRP-2) estão envolvidas na melanogênese, na qual acontece a conversão de tirosina em pigmentos de melanina. A tirosinase tem uma importância particular nesse processo porque catalisa duas reações-limite na melanogênese: a hidroxilquilação da tirosina a 3,4- dihidroxifenilalanina (DOPA) e a oxidação da DOPA, a qual resulta em dopaquinona (HEARING & TSUKAMOTO, 1991).

Recentemente, foi demonstrado que o estresse oxidativo e o acúmulo de radicais livres, na epiderme de pacientes com vitiligo, estão envolvidos com a patofisiologia da doença (SCHALLREUTER *et al.*, 2008). Além disso, a epiderme de pacientes com vitiligo está sob estresse oxidativo em função do acúmulo de  $H_2O_2$  (SCHALLREUTER, 1999). Sob condições normais, a concentração de  $H_2O_2$  é de aproximadamente  $1,0 \times 10^{-6}$  M. O balanço redox estabelecido entre esta espécie oxidante e uma série de enzimas (catalase, glutathione redutase, glutathione peroxidase, entre outras) promove a homeostase celular. Entretanto, concentrações da ordem de  $1,0 \times 10^{-3}$  M de  $H_2O_2$  foram determinadas *in vivo* em pacientes com vitiligo por espectroscopia Raman, bem como, de seu produto de oxidação: o sulfóxido de metionina proveniente da oxidação da metionina (SCHALLREUTER, 1999). O estresse oxidativo mediado pelo radical  $H_2O_2^{\cdot}$  possui fontes endógenas e exógenas. Entre as endógenas podem ser destacadas: a atividade da xantina oxidase epidermal forma  $H_2O_2$  e, como consequência, acontece à oxidação do ácido úrico que tem como produto a alantoína, situação característica em pacientes com vitiligo e ausente em pessoas sem essa anomalia (SHALBAF *et al.*, 2008); e aumento na formação de peróxinitrito ( $NO + O_2^{\cdot-} \rightarrow$  peróxinitrito) (ANDERSON *et al.*, 2003). Fatores exógenos como radiação

UV, raios-X e fenóis como as quinonas podem contribuir com o desequilíbrio oxidativo (SCHALLREUTER *et al.*, 2008).

Várias abordagens de tratamento do vitiligo estão disponíveis, incluindo o uso de fitomedicamentos e fitocosméticos. No Egito Antigo para o tratamento do vitiligo eram utilizados extratos da planta *Ammi majus*, seguida de exposição ao sol. Foi El-Mofty quem lançou, em 1947, o tratamento do vitiligo pelo emprego de substância fotossensibilizante obtida de *Ammi majus* Linn, a qual continha amoidino-8-isoamilinpsoraleno e bergapteno como princípios ativos. A repigmentação era promovida pela sensibilização da pele seguida de exposição ao sol (AZAMBUJA, 1981). Entretanto, é relatado na literatura que essa planta é capaz de provocar dermatite fototóxica (ROELANDTS, 2003).

Kavli *et al.* (1983) estudaram o efeito fotoprotetor das furanocumarinas bergapteno, pimpinellina, angelicina e sfondina, extraídas da planta *Heracleum laciniatum*. Foi observado que a aplicação das furocumarinas foi capaz de reduzir a incidência de eritemas em pacientes submetidos à fototerapia, principalmente nas regiões de 330-350 nm.

Pacientes com vitiligo foram submetidos ao tratamento com uma formulação denominada de Vitiliklu, composta por quatro plantas da flora brasileira (*Echinodorus grandijorus*, *Anchietea salutaris*, *Boerhaavia hissuta* e *Baccaris trimera*) ricas em flavonóides, alcalóides e taninos. Durante cinco anos de tratamento, os pacientes também foram submetidos à exposição solar por, aproximadamente, 23 vezes por semana. Foi observada uma repigmentação completa nas regiões afetadas, sugerindo-se que essa formulação poderia ser utilizada para o tratamento do vitiligo (DA SILVA & FONTES, 1997).

A literatura tem descrito o uso oral ou tópico de extrato de *Polypodium leucotomos* para o tratamento do vitiligo, uma vez que essa planta tem apresentado propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e imunomodulatórias *in vitro*. No referido estudo, pacientes foram submetidos ao tratamento PUVA associado ao uso do extrato vegetal, com vistas a diminuir a incidência de afecções cutâneas advindas da fototerapia e fotoquimioterapia. Os resultados obtidos permitiram demonstrar que a planta foi capaz de provocar um melhor efeito fotoprotetor contra eritemas, sugerindo que ela poderia ser utilizada como coadjuvante no tratamento do vitiligo (GONZÁLEZ *et al.*, 1997).

Em um estudo onde foram avaliadas 28 plantas tradicionalmente utilizadas no tratamento de vitiligo, foi observado que os extratos aquosos das raízes de *Astragalus membranaceus*, *Dictamnus dasycarpus* e *Ophiopogon japonicus*; das cascas de *Citrus reticulata* e dos frutos de *Tribulus terrestris* apresentaram estimulação significativa ( $P < 0,05$ ) da proliferação de melanócitos, o que sugere que tais espécies são agentes com potencial repigmentante no tratamento de vitiligo (LIN *et al.*, 1999).

Investigações farmacológicas demonstraram que o extrato de *Ginkgo biloba* foi capaz de diminuir, significativamente, a progressão das máculas de pacientes com vitiligo. Os autores sugerem que o efeito da planta estaria associado às suas propriedades antioxidante e imunomodulatória, uma vez que na etiologia da doença estão envolvidos fatores imunológicos e quadros de estresse oxidativo. Dessa forma, os autores entendem que o extrato do *Ginkgo biloba* parece ser uma terapia simples, potente e razoavelmente eficaz para o combate à progressão da doença (PARSAD *et al.*, 2003).

Uma prescrição complexa usada tradicionalmente para o tratamento do vitiligo foi preparada a partir de extrato aquoso de oito tipos de plantas, com o objetivo de estudar seu possível efeito na expressão de genes em células de melanoma. Observou-se que a prescrição foi capaz de ativar a expressão do gene da ATP-6-sintase, cujo efeito poderia ser o de contribuir para o tratamento do vitiligo. Esta atividade pode ser importante no tratamento de vitiligo, necessitando, entretanto, de investigações mais aprofundadas (LI *et al.*, 2004).

Em um estudo de avaliação do efeito da fruta de *Malytea scurfpea* na adesão e na migração de melanócitos, foi possível constatar que houve maior migração e adesão dos melanócitos tratados com a planta, quando comparado ao controle negativo, sugerindo ser esse o possível efeito da mesma sobre o tratamento do vitiligo (MOU *et al.*, 2004).

A atividade de extratos aquosos da raiz de *Angelica sinensis*, uma planta utilizada na medicina chinesa tradicional para o tratamento do vitiligo, foi testada em cultura de melanócito de camundongos, com o objetivo de avaliar o efeito proliferativo. Os resultados obtidos mostraram que na faixa de concentração testada (0 a 2500 µg/mL), esses extratos não foram capazes de estimular a proliferação dos melanócitos, além de provocar citotoxicidade (RAMAN *et al.*, 1996).

O uso das raízes e cascas do caule de *Brosimum gaudichaudii* na medicina popular para o tratamento das manchas do vitiligo por meio de fórmula preparada por decocção ou infusão é reportada por RODRIGUES e DE CARVALHO (2001).

Jang *et al.* (2008), avaliaram a atividade da fração diclorometano do extrato de *Cimicifuga heracleifolia* no que diz respeito a ativação da melanogênese por meio do aumento da atividade da tirosinase. Os resultados mostraram que o extrato investigado inibiu a atividade da tirosinase e proteína tirosinase relacionada, diminuindo, dessa forma, os níveis intra-celulares de melanina.

Assim, pode-se constatar que o uso de plantas para o tratamento do vitiligo tem sido pesquisado e utilizado como uma das opções terapêuticas, apesar de haver ainda a necessidade de maiores estudos para comprovação de sua eficácia e segurança.

### 3.2 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE, INVESTIGAÇÕES FITOQUÍMICAS E FARMACOLÓGICAS

A família *Bignoniaceae* compreende aproximadamente 800 espécies distribuídas em 113 gêneros entre árvores, arbustos e lianas, encontradas em regiões tropicais e subtropicais, principalmente na América do Sul (JUDD *et al.*, 1999). A família encontra-se segregada em oito tribos, das quais quatro ocorrem no Brasil, sendo representada por 51 gêneros, 40 pertencentes à Bignonieae, um à Crescentieae, um à Schlegelieae e nove à Tecomeae, totalizando aproximadamente 450 espécies (SCUDELLER, 2004).

O gênero *Pyrostegia* C. Presl. é representado na América do Sul tropical pelas espécies *P. venusta* (Ker Gawl.) Miers, *P. dichotoma* Miers ex K. Schum., *P. cinerea* Bureau ex K. Schum., *P. millingtonioides* Sandwith (POOL, 2008).

A espécie *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (sinonímia *Pyrostegia ígnea* e *Bignonia venusta*), conhecida como flor-de-são-jão, cipó-de-são-jão, cipó-bela-flor, cipó-de-fogo, cipó-caititu, dedo-de-moça, marquesa-de-belas e

cipó-pé-de-lagartixa é uma trepadeira lenhosa, nativa em quase todo o Brasil. Apresenta inflorescências de cor laranja intensa entre maio e setembro, variando em cada estado do Brasil (FIGURA 1). Na região sul, tem expressiva dispersão, sendo encontrada nas orlas das matas, nos campos, no litoral e na beira de estradas (DE SAMPAIO, 1991). Em pastos é considerada invasora, onde foram registrados casos de envenenamento de bovinos após sua ingestão (PEREIRA, 1984).



FIGURA 1 – FLORAÇÃO DE *PYROSTEGIA VENUSTA*

FONTE: <http://www.plantsgallery.com>

O extrato alcoólico de flores de *P. venusta* é empregado, na medicina popular, para o tratamento tópico de manchas brancas no corpo, como leucodermas e vitiligo (LORENZI, 1982; FERREIRA *et al.*, 2000). As folhas e caules são empregados como tônico e no tratamento de diarreia e disenteria (LORENZI, 1982; MARTINS *et al.*, 2003). Uma infusão preparada a partir de cascas e raízes de *P. venusta* é amplamente usada no tratamento de infecções uterinas e do trato genital feminino, erisipela e icterícia (hiperbilirubinemia e deposição de pigmentos biliares) em bebês recém nascidos (SENS, 2002).

Um estudo químico realizado com 14 espécies dessa família, entre elas a *P. venusta*, revelou a presença de fenóis e siringila, não sendo encontrados outros compostos (SATYAVATHI *et al.*, 1984) e o padrão floral contendo antocianinas exibiu pequena variação na família Bignoniaceae (SCOGIN, 1980).

A primeira investigação fitoquímica de *P. venusta* realizada com as flores resultou no isolamento e caracterização de  $\beta$ -sitosterol (**1**), *n*-hentriacontano (**3**),

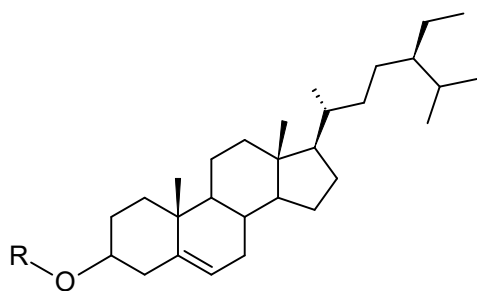
7-O- $\beta$ -D-glicopiranosilacetina **(4)** e *meso*-inositol (*myo*-inositol) **(5)** (DUBEY & MISRA, 1976). Investigações posteriores com as flores e partes áreas resultaram no isolamento de  $\beta$ -sitosterol **(1)**,  $\beta$ -amirina **(6)**, estigmasterol **(7)**, ácido oleanólico **(8)** betulina **(9)**, acetato de lupeíla **(11)** e lupeol **(10)** (KRISHNA *et al.*, 2002). O teor de açúcares presentes no néctar das flores foi determinado em 22% através do método fenol – ácido sulfúrico. Cromatografia em papel descendente indicou que o néctar consistia de sacarose, glicose e frutose, sendo que oligossacarídeos não foram detectados (GOWDA & ANJANEYALU, 1979). Estudos com os talos da planta conduziram ao isolamento de betulina **(8)**, lupeol **(12)**, ácido betulínico **(10)** e cloreto de colina **(16)** (DINDA *et al.*, 2002). Investigações realizadas com o extrato etanólico das raízes forneceram quatro substâncias, sendo elas alantoína **(13)**,  $\beta$ -sitosterol **(1)**, 3- $\beta$ -O- $\beta$ -D-glicopiranosilsitosterol **(2)** e a flavonona hesperidina **(15)** (FERREIRA *et al.*, 2000). Com relação ao estudo químico das folhas há dois trabalhos que descrevem o isolamento do flavonóide rutina **(14)** (BLATT *et al.*, 1998) e a quantificação dos flavonóides foliares e compostos fenólicos totais (SANTOS & BLATT, 1998). Recentemente, foram investigadas as sementes de *P. venusta* no que diz respeito ao perfil e quantidades de ácidos graxos presentes. Neste estudo foram encontrados os seguintes ácidos graxos em maiores concentrações: o ácido oleico com 56,2% (m/m), ácido palmítico 20,6% (m/m), ácido esteárico 15,3% (m/m), ácido linoleico 7,8% (m/m), do total de 64,0% de ácidos graxos insaturados, bem como, 35,9% de ácidos graxos saturados (PINHO *et al.*, 2009).

Mondal *et al.* (2009), realizaram a especiação e a determinação quantitativa dos aminoácidos livres no pólen de espécies de várias famílias de Angiospermas, entre as quais *P. venusta*, e observaram que o pólen desta espécie apresentava ausência do aminoácido prolina mas presença de quantidades apreciáveis de hidroxiprolina. A composição e a concentração de carotenóides presentes nas flores de *P. venusta* foram investigadas por CLAE, em fase reversa, e a luteína **(17)** foi o carotenóide majoritário, 52,4 mg/kg em 187,0 mg/kg de carotenóides totais (TINOL *et al.*, 2006).

Segundo SANTOS *et al.* (2007), os extratos preparados com as folhas de *P. venusta* demonstraram promissora atividade antimicrobiana e uma possível atividade antitumoral.

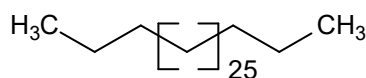
No trabalho publicado por MAGALHAES *et al.* (2010), foram investigados os efeitos genotóxicos de extratos etanólicos de *P. venusta* em medula óssea de camundongos utilizando o Teste de Micronúcleo e o de Aberração Cromossômica. Os resultados demonstraram que *P. venusta* não apresentou efeito genotóxico.

O efeito inibitório de 73 espécies nativas, da região central da Argentina, sobre a acetilcolinesterase foi investigado. A triagem das plantas foi realizada por meio de análises por cromatografia em camada delgada e microplacas (Método de Ellman). Foram avaliados extratos orgânicos e aquosos das plantas e, diferentemente de outras espécies pesquisadas, os extratos de *P. venusta*, apresentaram moderada percentagem de inibição da acetilcolinesterase (CARPINELLA *et al.*, 2010).

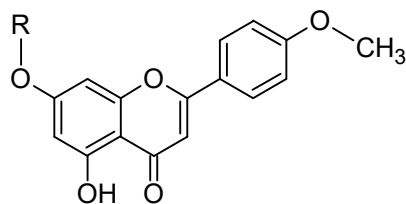


(1) R = H

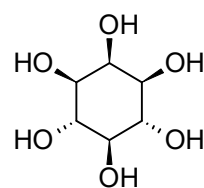
(2) R =  $\beta$ -Glucose



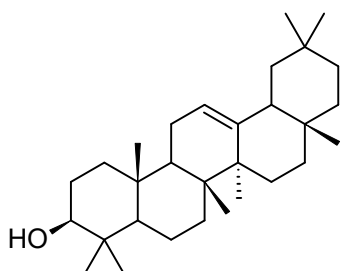
(3)



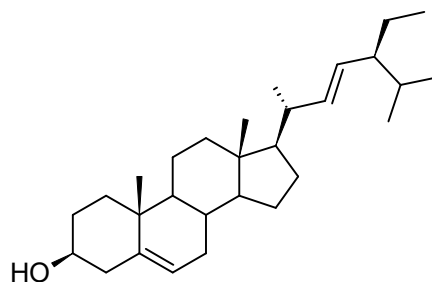
(4) R =  $\beta$ -Glucose



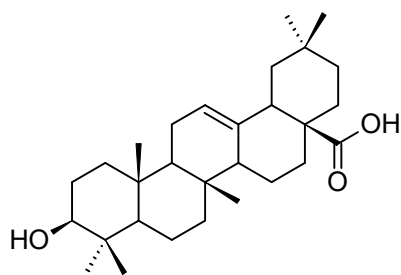
(5)



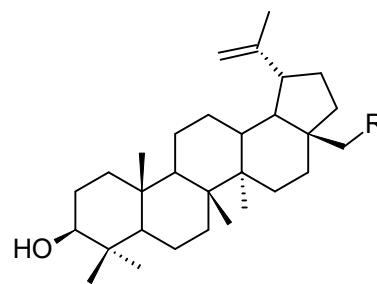
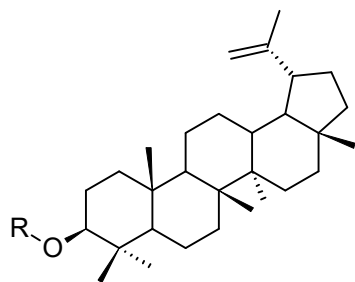
(6)



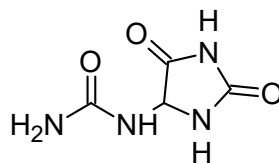
(7)



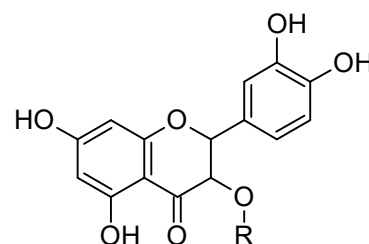
(8)

(9) R = CH<sub>2</sub>OH(10) R = CO<sub>2</sub>H(11) R = CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H

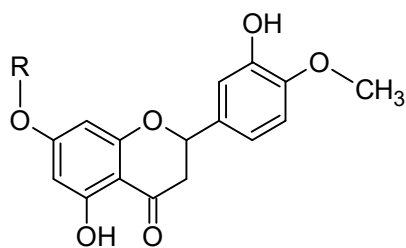
(12) R = H



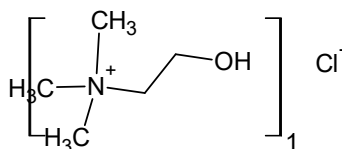
(13)



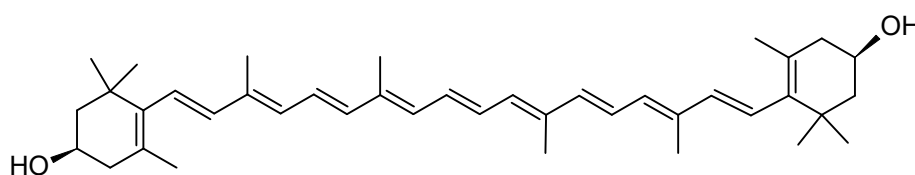
(14) R = β-Glucose e α-Ramnose



(15) R = Rutinosídeo



(16)



(17)

### 3.3 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE TINTURAS

No que diz respeito aos processos de extração de drogas, estes podem ser divididos em: processos não exaustivos, que resultam no estabelecimento de uma concentração de equilíbrio entre solução e resíduo sólido, e processos exaustivos, nos quais a droga é extraída exaustivamente (LIST & SCHMIDT,



2000). Dentre os processos não exaustivos, destacam-se a maceração e a turbólise.

A maceração é definida como a extração da droga com um solvente com um número definido de agitações diariamente ou agitações à temperatura ambiente. Mais especificamente, a maceração dinâmica é realizada à temperatura ambiente, assim como, a maceração, mas o material é mantido sob constante agitação.

Na turbólise (extração turbo), a planta moída é agitada no solvente com alta velocidade de rotação com um homogeneizador (FIGURA 2). As forças envolvidas quebram as partículas da droga tornando-a menor do que ela entrou. A difusão das substâncias extraídas pelas membranas celulares é substituída pela “lavagem” da célula destruída. Isso resulta em rápido estabelecimento do equilíbrio de maceração em curto tempo. Por outro lado, neste processo a temperatura pode subir durante a extração o que é indesejado para a extração dos compostos termolábeis. Em geral, melhores resultados são atingidos quando se usa a extração turbo comparativamente a maceração e maceração cinética (LIST & SCHMIDT, 2000).

Tomando-se em conta que as preparações alcoólicas de flores de *P. venusta*, empregadas na medicina popular, são aplicadas topicamente em pacientes com vitiligo ou leucodermas, é conveniente a preparação tinturas que, segundo a Farmacopéia Alemã (1978), são extratos de drogas vegetais preparados com etanol de concentração variável, éter ou misturas desses solventes. Uma parte da droga é extraída com mais que duas partes do líquido extrator, mas não mais que dez partes do solvente.

A avaliação da qualidade de uma tintura inicia-se com a análise da matéria-prima, atentando-se principalmente para a identificação botânica ou zoológica (DESMICHELLE, 1987). Após o processo de produção, as tinturas devem passar por vários ensaios dentre eles: identificação, características organolépticas, resíduo seco, doseamento de compostos marcadores, como compostos polifenólicos, entre outros. Todos esses ensaios são importantes para assegurar o padrão de qualidade, atendendo uma especificação pré-estabelecida (PRISTA *et al.*, 1979).

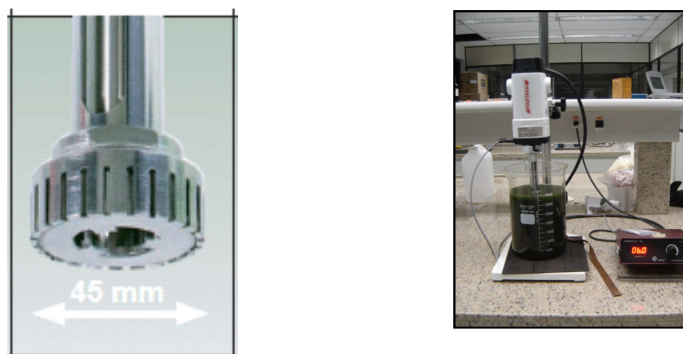


FIGURA 2 – ROTOR E O APARATO EXPERIMENTAL DA EXTRAÇÃO TURBO

FONTE: [http://www.kinematica-inc.com/8\\_Download/Doku/PPP\\_english.pdf](http://www.kinematica-inc.com/8_Download/Doku/PPP_english.pdf)

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BOTÂNICO DE *P. venusta*

O material botânico (flores, folhas, talos e raízes) foi coletado sob a coordenação do Dr. Antônio Aparecido Carpanezi do Departamento de Ecologia Florestal Aplicada da Embrapa Florestas. A coleta foi feita durante os meses de julho, agosto e setembro de 2008 na região de Colombo/PR. A exsicata encontrase depositada no Herbário Gerdt Hatschbach do Jardim Botânico de Curitiba/PR sob o número 338804-02.

Após separação das partes da planta – flor, folha, talo e raiz – o material botânico foi secado em estufa com circulação de ar Marconi MA-033 a  $\pm 40\text{ }^{\circ}\text{C}$  e depois foi reduzido a pedaços menores seguido de moagem em moinho de facas para posterior extração. Após processamento do material botânico foram obtidas as quantidades apresentadas no QUADRO 1.

QUADRO 1 – QUANTIDADES DO MATERIAL BOTÂNICO OBTIDAS APÓS MOAGEM

Parte da Planta	Massa (g)
Flores	2300g
Folhas	2200g
Talos	2700g
Raízes	2100 g

## 4.2 EXTRAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

### 4.2.1 Obtenção das tinturas via Turbólise e Maceração Dinâmica em escala laboratorial

Dois métodos de extração não exaustivos foram escolhidos para a preparação das tinturas em escala laboratorial, a maceração dinâmica e a turbólise (FIGURA 3).

A maceração dinâmica hidro-alcoólica (30:70, v/v) para cada uma das partes da planta – flor, folha, talo e raiz – foi realizada na proporção 20 g de droga com tamanho de partículas contido no intervalo de 250 µm a 350 µm ou 45 a 60 aberturas por polegada linear / 100 mL de solução extratora por 24 horas.

A extração hidro-alcoólica (30:70, v/v) por turbólise para cada uma das partes da planta – flor, folha, talo e raiz – foi realizada na proporção 20 g de droga (mesmo intervalo de tamanhos de partícula que a maceração) / 100 mL de solução extratora utilizando o homogeneizador Ultra Turrax Biotrona BA 80, Kinematica AG (FIGURA 2), por duas horas e a velocidade rotacional do turbo-rotor foi de 3600 rpm (60 Hz). Imediatamente após a preparação das tinturas foram armazenados em congelador a - 20 °C.

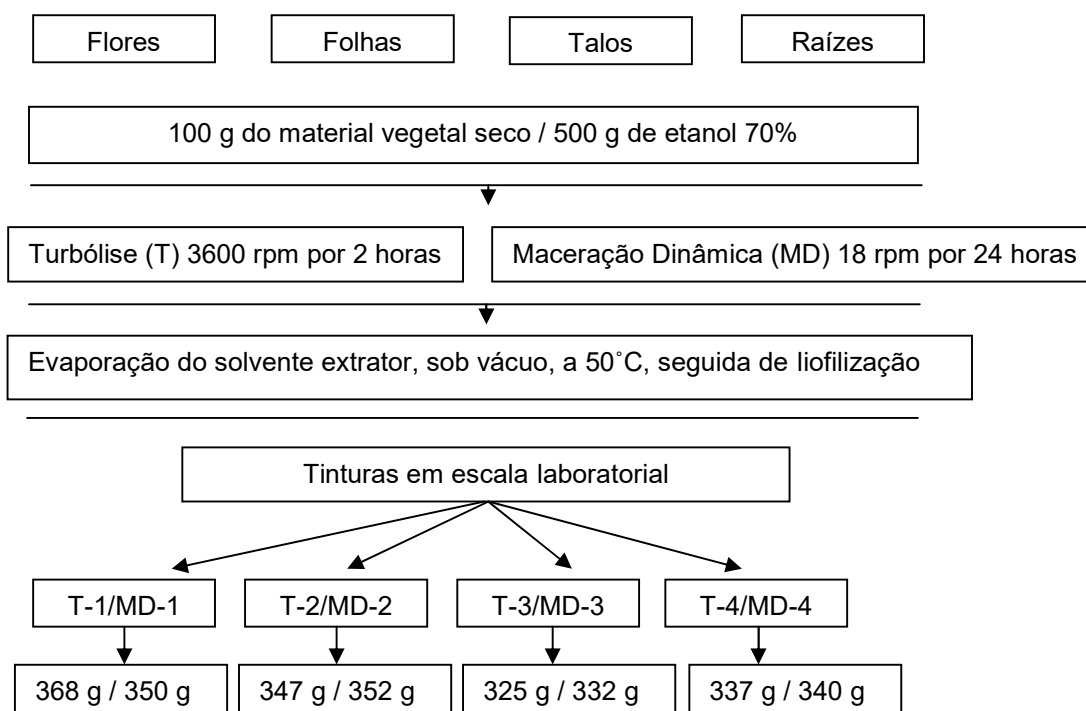


FIGURA 3 – FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DAS TINTURAS DE *P. VENUSTA*, EM ESCALA LABORATORIAL

#### 4.2.2 Obtenção dos extratos brutos via extração turbo em escala piloto

A preparação das tinturas em escala laboratorial serviu de material de partida para a definição da técnica de extração com base nos resultados das análises de resíduo seco, RMN de  $^1\text{H}$  e polifenóis (ITENS 5.1.1 a 5.1.3).

As tinturas das flores, folhas e raízes foram obtidas em escala piloto, via extração turbo, utilizando o homogeneizador Ultra Turrax Polytron PT 45/80 Kinematica AG (FIGURA 4). As amostras foram extraídas via turbólise hidro-alcoólica (30:70, v/v) durante duas horas e a velocidade rotacional do turbo-rotor de 3600 rpm (60 Hz). Para a preparação das tinturas foram utilizados 1,8 Kg, 1,7 kg e 1,6 Kg, das respectivas partes da planta. A proporção solvente/material botânico foi a mesma utilizada na escala laboratorial. As tinturas foram centrifugadas e, em seguida, filtradas em funil de Büchner com papel filtro. As tinturas foram concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida e, em seguida, liofilizadas.

Após obtenção dos extratos brutos de flores, folhas e raízes, 10 g de cada extrato foi fracionado através de cromatografia em coluna (40 cm x 5 cm, h x  $\phi$ ) utilizando sílica gel 60 (Merck), com tamanho de partícula 0,063 mm – 0,200 mm (70–230 mesh). A eluição foi feita com uma sequência de polaridade crescente de solventes: hexano (1,5 L), acetato de etila (1,5 L), etanol (2,0 L) e metanol 90% (1,0 L). A escolha de uma solução aquosa metanólica em detrimento de uma etanólica para o eluente de maior polaridade se deve a diferença de viscosidade entre estes dois solventes (Etanol = 1,20 cP e Metanol 0,54 cP). Soluções aquosas de etanol dificultam sobremaneira o processo de eluição em função da viscosidade da solução obtida.

Os solventes orgânicos das frações hexânica, acetato de etila, etanólica e metanólica de flores, folhas e raízes foram evaporados à secura em rotaevaporador a 50 °C, sob pressão reduzida. As frações metanólicas 90% de cada parte da planta ainda foram liofilizadas antes das pesagens para determinação do rendimento (TABELA 3).

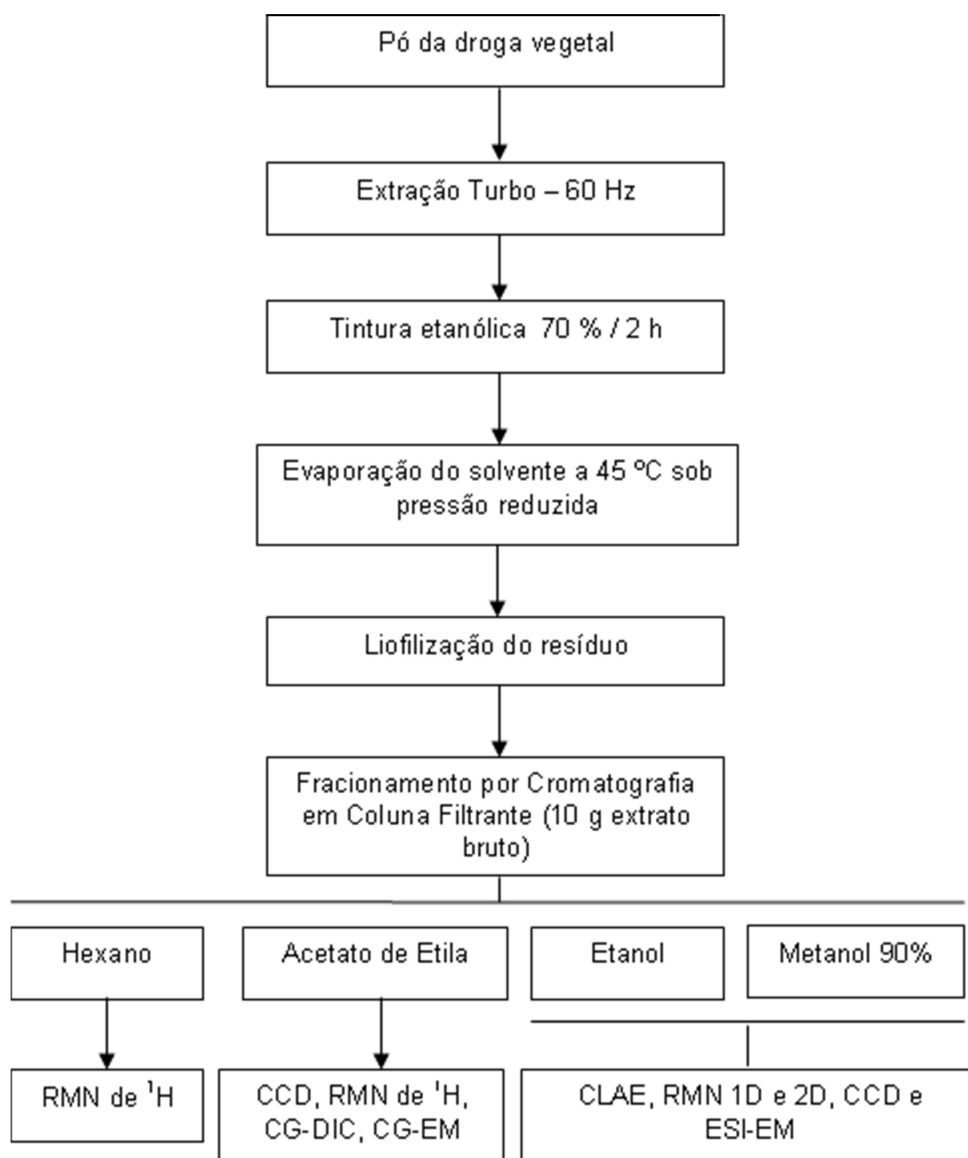


FIGURA 4 – FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DE *P. VENUSTA* EM ESCALA PILOTO VIA TURBÓLISE E FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS

O RMN DE <sup>1</sup>H foi empregado em todas as frações obtidas por se tratar de um técnica universal para prospecção de metabólitos secundários neste estudo fitoquímico de *P. venusta*. Já a CCD e CG-DIC foi empregada na fração acetato de etila em função de que esta fração tem polaridade intermediária e, portanto, poderia apresentar compostos como triterpenos, fitoesteróis, entre outros. E as frações mais polares, etanólica e metanólica, foram investigadas por CLAE e ESI-EM, pois, primeiramente, foram aquelas que apresentaram os maiores rendimentos ou massas após a cromatografia de adsorção em coluna (TABELA

3). Além disso, as investigações preliminares com RMN-H apontaram sinais importantes em regiões do espectro que sugeriam a presença de flavonoides.

#### 4.3 MÉTODOS DE ANÁLISE PARA COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO

Com o objetivo de comparar as técnicas de extração empregadas na preparação das tinturas de *P. venusta* foram utilizadas as seguintes técnicas analíticas: análise de resíduo seco, análise de polifenóis totais, cromatografia em camada delgada comparativa e RMN de  $^1\text{H}$ .

As tinturas de flores, folhas, talos e raízes de *P. venusta* foram preparadas por meio de dois métodos de extração. A identificação das amostras, com base nos diferentes métodos de extração e das diferentes partes da planta utilizada, está demonstrada no QUADRO 2.

QUADRO 2 – IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Métodos de Extração	Partes da Planta			
	Flores	Folhas	Talos	Raízes
Turbólise	T-1	T-2	T-3	T-4
Maceração	MD-1	MD-2	MD-3	MD-4

##### 4.3.1 Análise de Resíduo Seco

As análises de resíduo seco das tinturas T-1 a T-4 e MD-1 a MD-4 foram realizadas segundo metodologia da Farmacopéia Brasileira (1988). Aproximadamente dois gramas das amostras de tinturas foram pesadas analiticamente, dentro de pesa-filtros. Os pesa-filtros devidamente identificados foram transferidos para uma estufa com circulação de ar a 110 °C. Transcorridos noventa minutos as amostras foram retiradas da estufa e colocadas em dessecadores. Após resfriamentos das amostras, elas foram pesadas novamente e a massa de cada amostra anotada. Este procedimento se repetiu até massa constante das amostras. As análises foram realizadas em duplicata.

### 4.3.2 Análise de polifenóis totais

#### 4.3.2.1 Preparo das amostras das tinturas MD-1 a MD-4 e T-1 a T-4

A determinação dos polifenóis totais foi realizada empregando-se o reagente de Folin-Ciocalteu (BRAY & THORPE, 1954). Preparou-se uma solução contendo aproximadamente 3 g de tintura em um balão volumétrico de 25 mL, utilizando água como diluente. Esta solução foi filtrada em papel filtro, reservando-se os primeiros 50 mL (Filtrado 1). Diluiu-se 5 mL do filtrado 1 em um balão volumétrico de 25 mL, empregando água como diluente (solução 1). Transferiu-se 2 mL da solução 1 para um balão volumétrico de 25 mL, adicionou-se 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 10 mL de água. Em seguida, completou-se o volume com solução de carbonato de sódio 290 g/L. Após trinta minutos em repouso, efetuou-se a leitura da absorbância a 760 nm em um Espectrofotômetro UV-VIS SHIMADZU modelo UV 2401 PC. As análises foram realizadas em duplicata.

#### 4.3.2.2 Preparo da solução padrão de ácido pirogálico

Foi preparada imediatamente antes da leitura uma solução aquosa de ácido pirogálico (aproximadamente 50 mg/100 mL), denominada solução 2. Diluiu-se 5 mL da solução 2 em um balão volumétrico de 100 mL, empregando-se água como diluente (solução 3). Transferiu-se 2 mL da solução 3 para um balão volumétrico de 25 mL, adicionou-se 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 10 mL de água. Em seguida, completou-se o volume com solução de carbonato de sódio 290 g/L. Após trinta minutos em repouso, efetuou-se a leitura da absorbância (760 nm).

Para determinação dos polifenóis totais foi empregada a seguinte fórmula:

$$\text{Teor de Polifenóis Totais (\%)} = \frac{62,5 \times A1 \times M2}{A3 \times M1}$$

Onde:

62,5 = fator de diluição das amostras;

A1 = absorbância dos polifenóis totais;

A3 = absorbância do ácido pirogálico;

M1 = massa das tinturas de *P. venusta*;

M2 = massa de ácido pirogálico.

#### 4.3.3 Análise por cromatografia em camada delgada - CCD

##### 4.3.3.1 Detecção de flavonóides por CCD

Para a análise de flavonóides nas tinturas de *P. venusta* (T-1 a T-4 e MD-1 a MD-4) foram utilizados dois sistemas de solventes e as placas foram posteriormente reveladas com NP-PEG (difenilboriloxietilamina 1% em metanol, seguida de solução polietilenoglicol 5% em etanol) solução para detecção de flavonóides e compostos fenólicos (WAGNER & BLADT, 2001).

No primeiro, foi utilizado o sistema de solvente formado por acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético/água (10:1,1:1,1:2,6, v/v) e o percurso da corrida cromatográfica foi de 7,5 cm.

A visualização das placas foi feita em luz UV a 365 nm. Os padrões utilizados foram rutina, ácido clorogênico, luteolina, vitexina e hesperidina.

No segundo, foi utilizado o sistema de solvente álcool isopropílico/hexano (40:60, v/v). A visualização das placas foi feita em luz UV a 365 nm. Os padrões utilizados foram acacetina e apigenina.

##### 4.3.3.2 CCD de triterpenos

Para a análise de triterpenos nas tinturas de *P. venusta* (T-1 a T-4 e MD-1 a MD-4) foram testados vários sistemas de solventes. Entretanto, foi utilizado o método cuja fase móvel é composta por hexano/acetato de etila (4:1, v/v) com revelador anisaldeído sulfúrico (0,5 mL de anisaldeído, 1,0 mL de ácido sulfúrico, 25 mL de ácido acético, 25 mL de etanol) solução para detecção de



triterpenos (MARTELANC *et al.*, 2007). Após aspersão do reagente as placas foram aquecidas a 100°C por cerca de 10 minutos. A visualização das substâncias foi feita sob luz visível. O percurso da corrida cromatográfica foi de 7,5 cm. Foram utilizadas soluções (0,1 mg/mL) dos padrões ácido oleanólico,  $\beta$ -amirina, betulina, e acetato de lupeíla.

#### 4.3.3.3 Detecção de fitoesteróis por CCD

Para a análise de esteróides nas tinturas de *P. venusta* (T-1 a T-4 e MD-1 a MD-4) foram utilizados dois sistemas de solventes e as placas foram posteriormente reveladas com anisaldeído sulfúrico. Após aspersão do reagente as placas foram aquecidas a 100°C por cerca de 10 minutos. A visualização das substâncias foi feita sob luz visível. Em ambos, foram utilizadas soluções (0,1 mg/mL) dos padrões de  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, estigmastanol e o percurso da corrida cromatográfica foi de 7,5 cm.

No primeiro, foi utilizado o sistema de solvente formado por acetona/clorofórmio/ácido fórmico (2:15:1,6, v/v) (Wagner & Bladt, 2001).

No segundo, foi utilizado o sistema de solvente formado por tolueno/acetato de etila/ácido acético (7:3:1, v/v) (Farmacopéia Européia, 2008).

#### 4.3.3.4 Detecção de alantoína por CCD

Para detecção de alantoína nas tinturas de *P. venusta* (T-1 a T-4 e MD-1 a MD-4) foi utilizado o sistema de solvente formado por butanol/água/ácido acético (6:2,5:1,5, v/v) e as placas foram posteriormente reveladas com o reagente p-dimetilaminobenzaldeído (125 mg de p-dimetilaminobenzaldeído em 25 mL de uma solução metanol e ácido clorídrico (3:1, v/v), após aspersão da solução reveladora as placas foram visualizadas sob luz visível (USP 29, 2006). Foi utilizada uma solução do padrão de alantoína 1 mg /mL em metanol 50%.

#### 4.3.3.5 Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) das tinturas, extratos brutos, frações e compostos isolados foram obtidos em um espectrômetro de RMN Bruker AVANCE 400 de campo magnético de 9,4 Tesla, observando os núcleos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  a 400,13 e 100,62 MHz, respectivamente. O equipamento estava equipado com uma sonda multinuclear ( $^1\text{H}$  e X-Núcleo) de observação direta de 5 mm, com gradiente de campo no eixo z. Os deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  são expressos em ppm relativos ao sinal do tetrametilsilano (TMS) em 0,00 ppm, como referência interna.

A tomada de amostra das tinturas foram definidas de modo que se obtivesse aproximadamente 30 mg de resíduo. A definição da tomada de cada amostra de tintura foi feita com base nos resultados do resíduo seco. Imediatamente antes das análises os resíduos foram dissolvidos em metanol deuterado com ajuda do banho de ultra-som. Todos os padrões foram dissolvidos no mesmo solvente.

Foram obtidos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de padrões de flavonóides e composto fenólico (rutina, acacetina, vitexina, apigenina, hesperidina e luteolina); esteróides ( $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e estigmastanol); triterpenos (betulina, acetato de lupeíla, ácido oleanólico,  $\beta$ -amirina); ácido clorogênico e alantoína. Os espectros dos padrões supracitados foram comparados com os espectros dos extratos de T-1 a T-4 e MD-1 a MD-4.

### 4.4 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

#### 4.4.1 Análise dos compostos fenólicos por CLAE

Os compostos fenólicos foram separados, em escala analítica, em um Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Agilent 1100 acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) e equipado com amostrador automático.

Nas análises por CLAE semi-preparativa, para o isolamento dos compostos fenólicos, foi utilizado um Cromatógrafo a líquido Waters acoplado a

um detector de arranjo de fotodiodos modelo 2998, equipado com amostrador automático modelo 717 Plus e um coletor de frações.

#### 4.4.1.1 Condições cromatográficas das análises em escala analítica

O método cromatográfico para análise de compostos fenólicos baseou-se no método originalmente publicado por Vukics *et al.* (2006). A coluna analítica utilizada foi a X-Terra C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm, Waters). A fase móvel empregada para a eluição dos analitos foi: A = Solução de ácido fórmico 0,1% em água e B = Metanol: THF (90:10, v/v). O gradiente de eluição empregado na análise foi: 77–47% do solvente A e 23–53% do solvente B de 0–18 minutos. Seguida de 47–0% do solvente A e 53–100% do solvente B de 18–23 minutos. De 23–30 minutos a composição de fase móvel manteve-se inalterada, isto é, 100% de B. Finalmente, em 31 minutos restabeceu-se a composição inicial do gradiente, o que foi mantido até o tempo final da corrida (34 minutos). A separação ocorreu a 35 °C e o fluxo foi de 1,0 mL/min. O eluato foi monitorado a 220 e 330nm, enquanto que para obtenção do espectro de UV o detector DAD foi programado para varredura entre 200 e 400 nm. O volume de injeção foi de 5 µL. As amostras de extratos de flores (1000 µg/mL), folhas (1200 µg/mL) e raízes (1300 µg/mL) foram preparadas pela dissolução na composição inicial da fase móvel e sonicadas por 15 minutos. Uma mistura de padrões de compostos fenólicos (rutina, ácido clorogênico, acacetina, vitexina, hesperidina), cujas concentrações estavam em torno de 200 µg/mL (m/v), foram também injetados com objetivo de identificar compostos e também de verificar a qualidade da separação cromatográfica quando da otimização das condições cromatográficas.

#### 4.4.1.2 Condições cromatográficas das análises em escala semi-preparativa

Para a separação dos compostos fenólicos foi utilizada a coluna X-Terra C-18 (300 x 7,8 mm, 10 µm, Waters). Os compostos fenólicos foram separados com a mesma composição de fase móvel e gradiente descritos em 4.4.1.1. A separação ocorreu a 35 °C e o fluxo foi de 2,8 mL/min. O eluato foi monitorado a

220 e 330 nm e o volume de injeção foi de 250 µL. As amostras de extratos de flores, folhas raízes foram preparadas da mesma forma como está descrito em 4.4.1.1. Os extratos flores foram injetados com concentração de aproximadamente 40 mg/mL (m/v) e os extratos de folhas e raízes com concentrações de aproximadamente 50 mg/mL (m/v).

#### 4.4.2 Análise de Alantoína por CLAE

##### 4.4.2.1 Condições cromatográficas

As análises cromatográficas da alantoína foram realizadas através de CLAE-DAD empregando uma coluna analítica Zorbax Aminopropil (250 x 4,6 mm e 5,0 µm, Agilent). A fase móvel empregada na separação foi: A = 80% Acetonitrila e B = 20% Tampão Fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 10 mM. O gradiente de eluição utilizado iniciou com: 80%–50% do solvente A nos 8 primeiros minutos. De 8,1–10 minutos passou de 50%–0% de A. De 10,1– 14 minutos foi restabelecida a composição inicial do gradiente. A separação ocorreu à temperatura ambiente e o fluxo foi de 1,0 mL/min. O eluato foi monitorado a 220 nm, o volume de injeção foi de 5 µL e o tempo de corrida foi de 13 minutos.

##### 4.4.2.2 Preparo das amostras de extratos brutos liofilizados

As amostras foram preparadas pesando-se 0,5 g dos extratos brutos ( flores e folhas) e 0,25 g (raízes). Transferiu-se 10 mL de tampão fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 10 mM (m/v) e as amostras foram sonicadas por 40 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm e o sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL, utilizando-se o tampão como diluente. As amostras foram filtradas por membrana de 0,45 µm e injetadas no cromatógrafo.

#### 4.4.2.3 Preparo das amostras de tinturas

As amostras foram preparadas transferindo-se 5 mL das tinturas para um balão de 50 mL e o solvente evaporado, sob pressão reduzida, a 50 °C. As amostras foram redissolvidas em 2 mL de tampão fosfato, filtradas por membrana de 0,45 µm e injetadas no cromatógrafo.

#### 4.4.2.4 Fortificação das amostras com solução padrão de alantoína

Foi pipetado 500 µL de uma solução padrão de alantoína 0,5 mg/mL (m/v) para um frasco de 2 mL. Em seguida, foi pipetada a mesma quantidade de amostra para o mesmo frasco. A solução padrão de alantoína foi injetada separadamente no cromatógrafo.

#### 4.4.2.5 Pré-purificação das amostras de tinturas e extratos brutos por SPE para análise de alantoína por CLAE

A limpeza das amostras de tintura e extrato bruto de flores, raízes e folhas de *P. venusta* foi realizado por meio da utilização de colunas de extração em fase sólida C18 (*endcapped*) de 500 mg. As colunas foram primeiramente ativadas com metanol P.A. (5 mL) e depois lavadas com água ultra-pura (6 mL). As amostras foram aplicadas no topo da coluna e a eluição foi feita pela passagem de tampão fosfato 10 mM (m/v). O eluato foi recebido em um balão volumétrico de 5 mL.

## 4.5 ANÁLISES DAS FRAÇÕES ACETATO DE ETILA POR CG

### 4.5.1 Condições cromatográficas das análises por CG-DIC

Para realização das análises de fitoesteróis das frações acetato de etila de flores (FLACET), folhas (FOACET) e raízes (RACET) por CG-DIC foi utilizado um cromatógrafo Agilent 6890N equipado com injetor automático.

As condições cromatográficas estabelecidas nesta análise foram:

- Injetor a 325 °C e injeção no modo split com razão de divisão 50:1.
- Forno da coluna com temperatura inicial de 200 °C e rampa de 10 °C por minuto até temperatura final de 300 °C de 3 a 35 minutos, com tempo total de corrida de 48 minutos.
- Coluna foi uma DB-1 de 30 m x 250 µm de diâmetro e 0,25 µm de espessura de filme. O hélio foi utilizado como gás de arraste.
- Detector a 325 °C e com fluxo de hidrogênio de 40 mL/min, ar sintético a 400 mL/min e nitrogênio a 25 mL/min como gás auxiliar.

### 4.5.2 Preparo dos padrões de fitoesteróis

Aproximadamente 1 mg de cada um dos padrões de  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, estigmastanol, campesterol e colesterol (todos adquiridos da Chromadex Inc., EUA) foram dissolvidos em clorofórmio. Foi pipetado 1 mL da solução de cada um dos padrões e transferidos para tubos de ensaio. O solvente foi evaporado com fluxo de nitrogênio gasoso. A reação de derivatização dos padrões foi realizada, primeiramente, pela adição de 300 µL de DMF e 300 µL de BSTFA 1% em TMSC e aquecimento a 70 °C por 60 minutos. A concentração dos padrões de fitoesteróis foi em torno de 230 µg/mL (m/v).

### 4.5.3 Preparo das amostras

Aproximadamente 30 mg das amostras FLAECT, FOACET e RACET foram dissolvidas em 3 mL de metanol e ultrasonificadas por 15 minutos. Foram

adicionados 2 mL de água e 10 mL de n-hexano. A amostra foi homogeneizada em agitador vortex. A fase hexânica foi evaporada com fluxo de nitrogênio. Para reação de derivatização dos fitoesteróis presentes na amostra foram adicionados 300 µL de DMF e 300 µL de BSTFA 1% em TMSC (m/v) e aquecimento a 70 °C por 60 minutos.

#### 4.5.4 Condições cromatográficas das análises por CG-EM

Para as análises por CG-EM de FLACET, FOACET e RACET foi utilizado o cromatógrafo a gás Varian CP-3800 acoplado ao espectrômetro de massas equipado com analisador quadrupolo modelo GC-MS 4000.

As condições cromatográficas estabelecidas foram:

- Injetor a 300 °C e injeção no modo split com razão de divisão 10:1.
- Forno da coluna com temperatura inicial de 100 °C e rampa de 10 °C por minuto até temperatura final de 280 °C de 3 a 20 minutos, com tempo total de corrida de 35 minutos.
- Coluna foi uma DB-1 de 30 m x 250 µm de diâmetro e 0,25 µm de espessura de filme. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste.
- O detector seletivo de massas operou com modo de ionização da amostra por impacto eletrônico (70 eV). O espectrômetro trabalhou no modo varredura completa (*full scan*) de 40 a 550 Daltons e com velocidade de scan de 0,34 s por scan. As temperaturas do quadrupolo e da fonte de ionização foram de 150 e 280 °C, respectivamente.

### 4.6 ANALISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR CLAE SEMI-PREPARATIVA

#### 4.6.1 Condições cromatográficas das análises IES-EM

Estas análises foram realizadas em espectrômetro de massas API 3200, triplo quadrupolo (Applied Biosystems MDS SCIEX). A aquisição e o processamento de dados foram realizados utilizando o software Analyst 1.4.2.

As subfrações FLETOH-13 e FLETOH-14 das flores de *P. venusta*, isoladas por CLAE semi-preparativa, foram analisadas utilizando fonte de ionização *ESI*. Para detecção dos íons no modo positivo, os seguintes parâmetros dos experimentos *full scan* foram ajustados:

- Cortina de gás ( $N_2$  – 99,999%) – 10 psi;
- Voltagem do capilar (IS) – 4500 V;
- Gás de nebulização (GS1,  $N_2$  – 99,999%) – 15 psi;
- Potencial de desagrupamento (DP) – 70 V;
- Potencial de entrada (EP) – 10 V.

Para os experimentos de EM/EM dos compostos FLETOH-13 e FLETOH-14, além dos parâmetros acima listados (análise *full scan* no modo positivo) foram ajustadas as voltagens da cela de colisão como segue abaixo:

- FLETOH-13:

- Potencial de entrada da célula (CEP) – 46,34 V;
- Energia de colisão (CE) – 35 V;
- Potencial de saída da célula (CXP) – 3,75 V.

- FLETOH-14

- Potencial de entrada da célula (CEP) – 61,65 V;
- Energia de colisão (CE) – 60 V;
- Potencial de saída da célula (CXP) – 3,75 V.

#### 4.6.2 Preparo das amostras

As amostras foram solubilizadas em metanol - solução de ácido fórmico 0,1% (1:1). A introdução das amostras no espectrômetro de massas foi feita por infusão direta na fonte de ionização *ESI* com bomba-seringa com fluxo constante de 10  $\mu$ L/min. A concentração das amostras foi de aproximadamente 250 ng/mL (m/v).



## 4.7 ENSAIOS *IN VITRO*

### 4.7.1 Ensaio de atividade da enzima tirosinase

A atividade da enzima tirosinase foi determinada de acordo com o método previamente descrito por HYUN *et al.* (2008), com algumas modificações. Dez mililitros de cada extrato de *P. venusta* em diferentes concentrações (0,3–2,1 mg/mL) e 20 µL de tirosinase de cogumelo na concentração de 500 U/mL foram adicionados a uma placa de 96 poços juntamente com 170 µL de uma mistura contendo L-tirosina (1 mM), solução de fosfato de potássio (50 mM) e água destilada na proporção de 10:10:9. A placa foi incubada a 37 °C por 40 minutos e a absorbância da solução foi determinada em um leitor de placas a 490 nm.

### 4.7.2 Ensaio de produção espontânea de melanina

#### 4.7.2.1 Preparo da cultura de células de melanoma

Células B16F10 provenientes da ATCC (*American Type Cell Collection*) foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido em meio de cultura acrescido de soro fetal bovino (SFB) 40 % (v/v) e DMSO 10 % (v/v). Para as análises, as células foram descongeladas a 37° C e semeadas em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco de alta glicose (DMEM) contendo 10 % de SFB e antibióticos. Para os repiques, o meio foi descartado e as monocamadas de células confluentes foram descoladas das garrafas de cultivo por tratamento com solução de tripsina-EDTA. Após o descolamento, as células foram lavadas com meio para a remoção da solução de tripsina-EDTA. Após suspensas, as células foram então distribuídas em novas garrafas de cultura estéreis e crescidas em estufa a 37 °C com 5 % de CO<sub>2</sub>. Para os experimentos as células foram semeadas em placas de 24 ou 96 poços a  $1,0 \times 10^4$  ou  $1,0 \times 10^5$  células/poço, respectivamente.

#### 4.7.2.2 Determinação do conteúdo de melanina nos melanócitos

A influência dos extratos da *P. venusta* sobre a produção de melanina nos melanócitos foi determinada de acordo com o método previamente descrito por JANG *et al.* (2008), com algumas modificações. As células foram semeadas e incubadas em placas de 96 poços, na concentração de  $1,0 \times 10^4$  células/poço. Após 24 horas as células foram expostas a diferentes concentrações dos extratos (10-1000 µg/mL) ou ao ácido kójico (1 mM), como controle positivo, e mantidas a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub> durante 4 dias. As células foram então lisadas em solução de NaOH 1N em DMSO 10 % a 80 °C durante 1 h. O conteúdo relativo de melanina foi determinado pela medida da absorbância a 470 nm em um leitor de placas e confrontado com uma curva padrão de melanina sintética (0-500 µg/mL) obtida para cada experimento.

#### 4.7.3 Ensaio de viabilidade celular pelo método do tetrazolium (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium (MTT)

O ensaio de viabilidade celular foi realizado após a exposição das culturas a diferentes concentrações de T-1 a T-4 (extratos obtidos via extração turbo) durante 96 horas (TADA *et al.*, 1986). Este foi feito no intuito de determinar a viabilidade celular. Primeiro, o meio de cultura foi retirado e adicionado meio DMEM/10 % SFB novo contendo 0,5 mg/mL de MTT. A placa foi então incubada por 4 h em estufa a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub> protegida da luz. Decorrido o tempo de incubação, o meio foi retirado e então adicionado 5 mL DMSO para solubilização dos cristais de formazan. A absorbância a 570 nm de cada poço da placa foi determinada usando leitor de placas.

#### 4.7.4 Análise estatística

Os resultados são expressos como a média  $\pm$  o desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância ANOVA de

uma via, ou teste T de Student, conforme o caso. Os valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS OBTIDOS EM ESCALA LABORATORIAL VIA EXTRATOR TURBO E MACERAÇÃO DINÂMICA**

Com o objetivo de comparar as técnicas de extração empregadas (turbólise e maceração dinâmica) e avaliar a qualidade das tinturas preparadas, foram realizadas análises de resíduo seco, determinação de polifenóis totais através de espectrofotometria UV-VIS, análises por CCD e RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos e comparação com padrões (flavonóides, triterpenos e esteróides e alantoína).

#### **5.1.1 Análise de resíduo seco**

Os extratos de todas as partes da planta obtidos por turbólise (T-1 a T-4) apresentaram maior quantidade de resíduo seco do que aqueles obtidos por maceração dinâmica (MD-1 a MD-4), conforme pode ser observado na TABELA 1. No entanto, maior percentagem de resíduo seco não implica necessariamente que foi extraído uma maior quantidade de metabólitos secundários, mas é um indicativo de que a extração via turbólise foi mais eficiente. Em se tratando de eficiência de extração, a turbólise foi 12 vezes mais rápida que a maceração, isto é, a extração por turbólise teve duração de 2 horas, ao passo que a maceração em 24 horas. A determinação do tempo para atingir o equilíbrio da extração para a turbólise foi realizado pela retirada monitoramento de alíquotas do extrato através da análise de fenóis totais até concentração constante.

TABELA 1 – RESÍDUO SECO DOS EXTRATOS OBTIDOS POR TURBÓLISE (T) E MACERAÇÃO DINÂMICA (MD).

<b>Amostras</b>	<b>Resultados em % (m/m)</b>	
	Turbolise (T)	Maceração Dinamica (MD)
Flores	7,10	6,13
Folhas	4,53	3,37
Talos	3,02	2,19
Raizes	2,68	2,17

### 5.1.2 Análise espectrofotométrica UV-VIS de polifenóis totais

A determinação de polifenóis totais confirmou as maiores quantidades de resíduo seco obtidos no processo de extração por turbolise, comprovando que esta realmente possui maior eficiência e eficácia na extração de metabólitos secundários, pelo menos, no que diz respeito a essa classe de compostos. Todas as partes de *P. venusta* extraídas por meio do extrator turbo apresentaram teores maiores em polifenóis totais, particularmente, os extratos de flores (T-1) exibiram um valor médio de 62,58 % maior que a mesma parte da planta extraída por maceração dinâmica (MD-1), conforme pode ser observado na TABELA 2.

TABELA 2 - POLIFENÓIS TOTAIS DOS EXTRATOS BRUTOS OBTIDOS POR TURBÓLISE (T) E MACERAÇÃO DINÂMICA (MD).

<b>Amostras</b>	<b>Resultados em % (m/m)</b>	
	Turbolise (T)	Maceração Dinamica (MD)
Flores	1,55	0,97
Folhas	0,34	0,18
Talos	0,27	0,14
Raizes	0,37	0,18

### 5.1.3 Análise por RMN de $^1\text{H}$

A comparação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das diferentes partes da planta em escala laboratorial mostrou total sobreposição dos espectros, evidenciando que todas as amostras possuem a mesma composição química,

como pode ser observado para os extratos das flores T-1 e MD-1 (FIGURA 5). Sendo assim, a comparação dos espectros evidenciou que ambas as formas de extração são qualitativamente equivalentes, ou seja, os mesmos compostos foram extraídos por ambas as técnicas. No entanto, se percebe que os sinais nas extrações por turbólise apresentaram maior intensidade nas mesmas concentrações daquelas obtidas por maceração (TABELAS 1 e 2). Em outras palavras, a extração via turbólise se mostrou quantitativamente mais eficaz na extração dos metabólitos secundários, como pode ser visto para as flores (FIGURA 5).

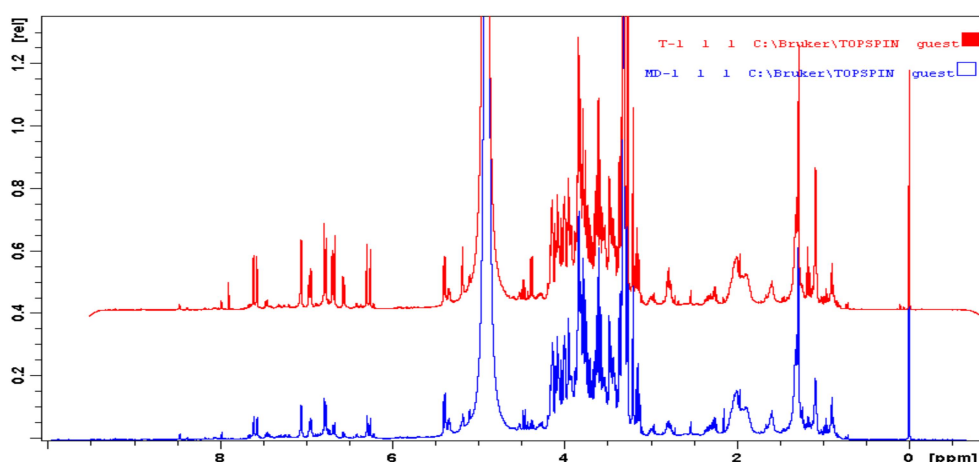


FIGURA 5 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE  $^1\text{H}$  DOS EXTRATOS DAS FLORES DE *P. VENUSTA* MD-1 (VERMELHO) E T-1 (AZUL).

Tais constatações não se restringem somente a essa parte da planta, na verdade, todas as demais partes da planta, tais como folhas (T-2), talos (T-3) e raízes (T-4) também apresentaram equivalência qualitativa entre os métodos de extração e superioridade em termos quantitativos para a extração via turbólise quando comparado com a maceração dinâmica.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de T-1 e MD-1 (FIGURA 5) e todas as demais partes da planta avaliadas evidenciaram sinais característicos de compostos alifáticos entre 0,5-2,0 ppm, uma segunda região, entre 3,0-4,0 ppm, indicando a presença de unidades glicosídicas e a região entre 6,0-8,0 ppm, sugerindo a presença de compostos aromáticos nos extratos.

#### 5.1.4 Análise por CCD

Os extratos de todas as partes da planta também foram avaliados por CCD por meio de comparações com padrões de flavonóides, triterpenos, esteróides e alantoína. Como resultado, observou-se que os mesmos compostos que estavam presentes em amostras obtidas por turbólise estavam também presentes naquelas obtidas por maceração, quando comparadas as mesmas partes da planta, novamente comprovando equivalência qualitativa na composição química dos extratos. O cromatograma apresentado na FIGURA 6A mostra a separação dos fitoesteróis  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e estigmasterol e nos extratos MD-1 a MD-4 eluidos com o sistema de solventes (WAGNER & BLADT, 2001). O estigmasterol (3) e  $\beta$ -sitosterol (1) não apresentaram separação, apresentando o mesmo  $r_f = 0,65$ . O estigmasterol (2) apresentou um  $r_f = 0,67$ . Os extratos MD-1 (4) a MD-4 (7) representadas no cromatograma da FIGURA 6A, apresentaram bandas com valores de índice de retenção iguais a 0,67 e 0,63. A separação não permitiu concluir qual esteróide está presente, mas é um indicativo da presença dessa classe de compostos nos extratos MD-1 a MD-4. Assim como evidenciado no cromatograma dos extratos obtidas por maceração, observaram-se também bandas correspondentes aos fitoesteróis nas amostras T-1 a T-4 (FIGURA 6B).

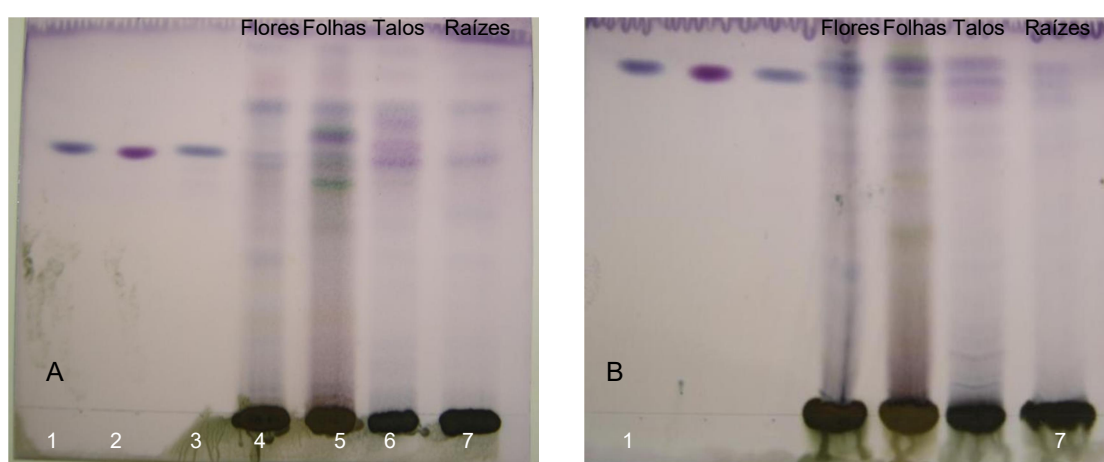


FIGURA 6 – ANALISE POR CCD DOS PADRÕES DE FITOESTERÓIS E TINTURAS DE *P. venusta*.

NOTA: A – Cromatoplaça dos padrões de fitoesteróis e das amostras MD-1 a MD-4 eluída no sistema de solventes (WAGNER BLADT, 2001); B – Cromatoplaça dos padrões de fitoesteróis e tinturas T-1 a T-4 no sistema de solventes proposto pela Farmacopéia Européia, 2008

A primeira fase móvel, descrita no item 4.3.3.1, aplicada a análise dos flavonóides de *P. venusta* separou de forma satisfatória esses compostos. Entretanto, a flavanona hesperidina não foi detectada nestas condições. Tanto as tinturas obtidas via maceração dinâmica (MD-1 a MD-4) quanto aqueles obtidos via turbólise (T-1 a T-4) apresentaram o mesmo perfil cromatográfico, ou seja, os mesmos compostos foram detectados nas duas situações. Foram aplicados os padrões de hesperidina (1), ácido clorogênico (2) ( $r_f = 0,56$ ), vitexina (3) ( $r_f = 0,78$ ), rutina (4) ( $r_f = 0,40$ ) e luteolina (5) ( $r_f = 0,68$ ) e tinturas T-1 (6), T-2 (7), T-3 (8) e T-4 (9) (FIGURA 7). É perceptível a presença de uma banda correspondente ao ácido clorogênico em todas as partes da planta investigadas; a rutina em T-1 e T-2, fracamente visível em T-3 e ausente em T-4. Com relação a vitexina é possível ver bandas fracas correspondentes em todas as amostras. As amostras testadas não apresentaram bandas correspondentes a luteolina.

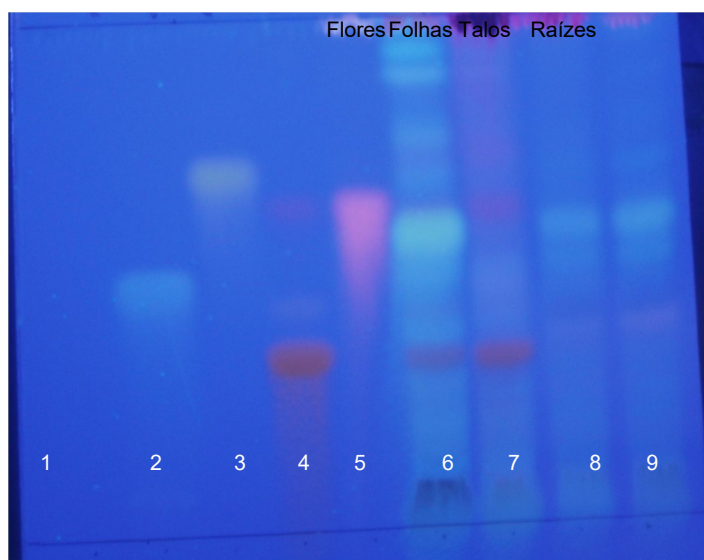


FIGURA 7 – ANÁLISE POR CCD DOS PADRÕES DE FLAVONÓIDES E TINTURAS T-1 A T-4

O método (MARTELANC *et al.*, 2007) empregado para a análise dos triterpenos de *P. venusta* separou de forma aceitável esses compostos. Tanto as tinturas obtidas via maceração dinâmica (MD-1 a MD-4) quanto aqueles obtidos

via turbólise (T-1 a T-4) apresentaram o mesmo perfil cromatográfico. Foram aplicados os padrões de ácido oleanólico (1) ( $rf = 0,16$ ),  $\beta$ -amirina (2) ( $rf = 0,47$ ), betiluna (3) ( $rf = 0,21$ ) e acetato de lupeíla (4) ( $rf = 0,84$ ) e tinturas T-1 (5), T-2 (6), T-3 (7) e T-4 (8) (FIGURA 8). Foi possível visualizar a presença de bandas correspondente aos triterpenos  $\beta$ -amirina e betiluna em todas as partes da planta investigadas; o acetato de lupeíla foi visualizado em T-2 e T-3, e ausente em T-1 e T-4. Com relação ao ácido oleanólico, é possível ver bandas fracas correspondentes em todas as amostras.

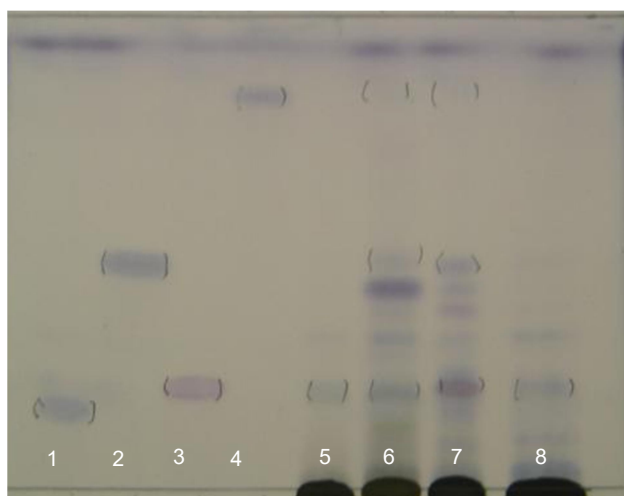


FIGURA 8 – ANÁLISE POR CCD DOS PADRÕES DE TRITERPENOS E TINTURAS T-1 A T-4

O método da USP 29 (2006) para investigação de alantoína (1) ( $rf = 0,45$ ) por CCD resultou na correspondência do padrão desta hidantoína somente nos extratos das raízes de *P. venusta*. A visualização das manchas respectivas ao padrão e amostras não foi muito nítida, mas foi possível identificar uma banda amarela na amostra T-4, o que pode ser visto na FIGURA 9.



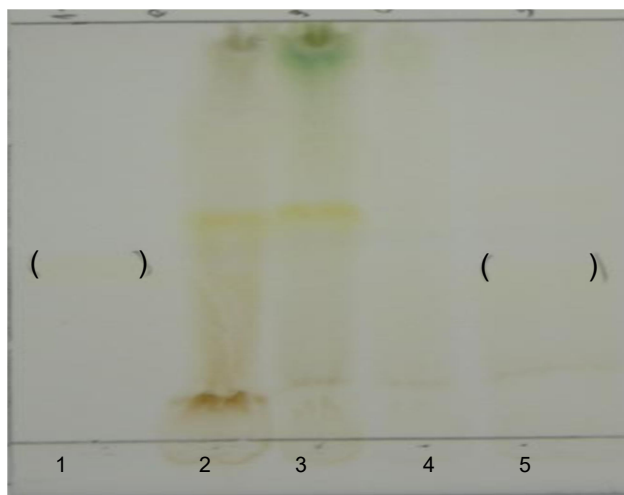


FIGURA 9 – ANÁLISE POR CCD DO PADRÃO DE ALANTOÍNA E TINTURAS T-1 A T-4.

## 5.2 ENSAIOS *IN VITRO*

### 5.2.1 Ensaio de atividade sobre a enzima tirosinase

Os extratos brutos de folhas, talos raízes e flores (MD-1 a MD-4 e T-1 a T-4) foram submetidos ao ensaio de atividade da enzima tirosinase pela pesquisadora Cintia Delai do Laboratório de Inflamação, Dor e Febre do Departamento de Farmacologia da UFPR (FIGURA 10). A tirosinase é uma importante enzima que participa de duas reações limites na melanogênese: a hidroxilação da tirosina e a oxidação da 3,4-diidroxi-fenilalanina (DOPA) a dopaquinona (HEARING & TSUKAMOTO, 1991).

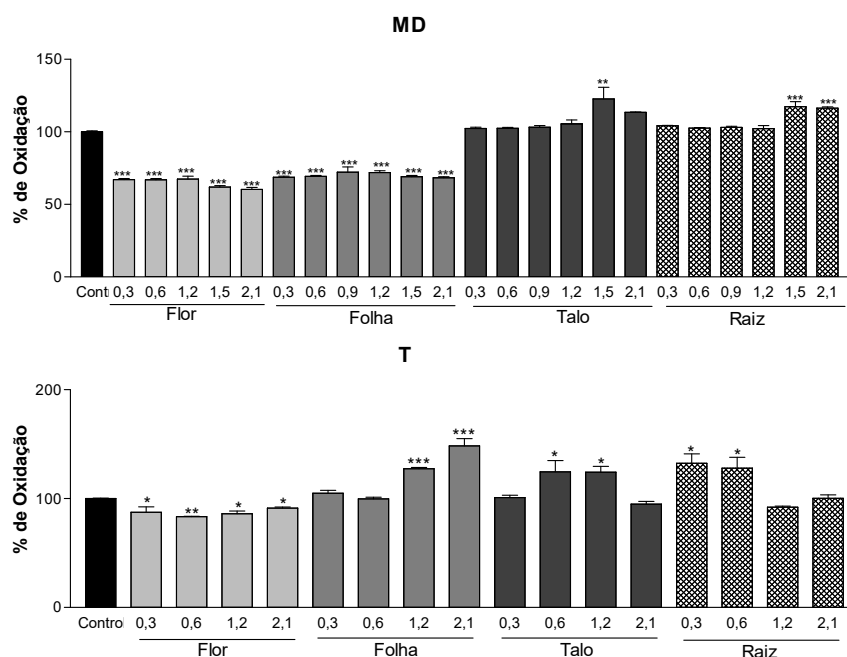


FIGURA 10 – EFEITO DOS EXTRATOS DE *P. venusta* SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA TIROSINASE.

NOTA: A – Extratos obtidos por maceração dinâmica; B – Extratos obtidos por turbólise

LEGENDA: Os pontos são representados pela media  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos mostram significância dos grupos em relação ao controle sendo \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 e \*\*\*P < 0,001

A ativação ou inibição da enzima tirosinase é avaliada pela percentagem de oxidação do substrato (*tirosina*) frente a um controle positivo. Aquelas concentrações, das diferentes partes da planta testadas, em que a percentagem de oxidação foi maior que 100 % da percentagem de oxidação do controle, podem ser consideradas como concentrações em que houve ativação da enzima tirosinase. Por outro lado, os extratos cujas concentrações mostraram decréscimo da percentagem de oxidação da tirosina, comparativamente ao controle, indicam que houve inibição da atividade da enzima tirosinase.

Os extratos das flores de *P. venusta* em todas as concentrações testadas, dos dois métodos de extração empregados, mostraram inibição da atividade da enzima tirosinase. No extrato de folhas, o extrato obtido via maceração dinâmica resultou em inibição da atividade da tirosinase, em todas as concentrações testadas. Por outro lado, o extrato bruto de folhas de *P. venusta*, obtido via turbólise, apresentou resultados promissores em função de ter causado a ativação da enzima tirosinase. As concentrações de 1,2 e 2,1 mg/mL (m/v)

apresentaram percentagens de oxidação marcadamente superiores ao controle ( $P < 0,001$ ).

Quanto ao extrato bruto dos talos de *P. venusta*, obtido via maceração dinâmica, houve expressiva ativação da tirosinase nas concentrações de 1,5 e 2,1 mg/mL. No entanto, o extrato obtido via turbólise, apresentou ativação da enzima tirosinase em concentrações ainda menores, ou seja, 0,6 e 1,2 mg/mL (m/v). Finalmente, o extrato bruto das raízes de *P. venusta*, obtido via maceração dinâmica, demonstrou ativação da enzima tirosinase nas concentrações de 1,5 e 2,1 mg/mL. Já o extrato bruto das raízes de *P. venusta*, obtido via turbólise, apresentou expressiva ativação da enzima tirosinase nas concentrações de 0,3 e 0,6 mg/mL.

Portanto, dos extratos obtidos por turbólise (T-1 a T-4) as folhas, talos e raízes intensificaram a atividade da enzima, ao passo que, no caso da maceração (MD-1 a MD-4), apenas os extratos de talos e raízes o fizeram.

Os resultados obtidos neste ensaio poderão servir de subsídio para indicar o mecanismo de ação (via) através do qual acontece aumento na produção espontânea de melanina, o que foi investigado no ensaio com as culturas de células. Neste ponto, é importante ressaltar também que mesmo aqueles extratos que inibiram a atividade de enzima tirosinase podem aumentar a produção de melanina na cultura de melanócitos por outros mecanismos.

#### 5.2.2 Ensaio de produção espontânea de Melanina e de viabilidade celular pelo método MTT.

Os extratos brutos de *P. venusta* (T-1 a T-4), obtidos por turbólise, foram submetidos ao ensaio de produção espontânea de melanina de acordo com metodologia descrita por KIM *et al.* (2008). Neste ensaio, concentrações crescentes (1, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL) dos extratos foram testadas com objetivo de investigar alterações sobre a produção de melanina em cultura melanócitos.

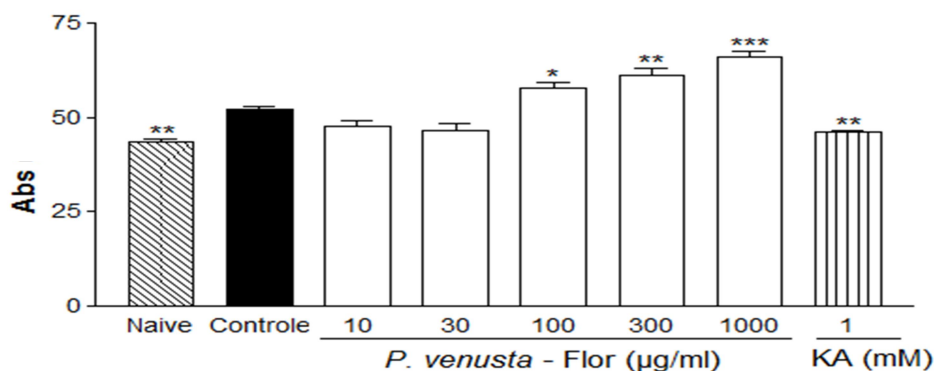


FIGURA 11 – Ação do extrato (T-1) das flores de *P. venusta* sobre a produção de melanina em melanócitos B16F10

LEGENDA: Ácido kójico (KA) é o controle positivo e os asteriscos mostram significância dos grupos em relação ao controle sendo \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$

A análise do gráfico da FIGURA 11 mostra que as concentrações de 100 a 1000 µg/mL (m/v) apresentaram significativo aumento na produção espontânea de melanina comparativamente ao controle. Por outro lado, como esperado, o ácido kójico inibiu a produção de melanina frente ao controle. Tais resultados demonstram que, a despeito da inibição de T-1 no ensaio com a enzima tirosinase, houve aumento na produção de melanina o que pode indicar que, em nível celular, o extrato é capaz de aumentar a produção de melanina espontaneamente. Em outras palavras, o mecanismo pelo qual T-1 estimulou a melanogênese não pôde ser explicado pelo ensaio de atividade da enzima tirosinase.

No método MTT, o sal de tetrazolio, que é um composto hidrossolúvel, é facilmente incorporado por células viáveis. Dentro das células, este composto é então reduzido nas mitocôndrias pelas desidrogenases gerando a formazana que não é solúvel em água e fica armazenado no citoplasma celular 39. A formazana pode ser solubilizada por solvente orgânico, como DMSO. Ao contrário do MTT, que apresenta coloração amarelo pálido, a formazana tem coloração azul-escuro e, quando solubilizada em DMSO, apresenta absorção máxima no comprimento de onda de 570 nm. Neste ensaio, portanto, o valor da absorbância obtido em 570 nm é proporcional ao número de células viáveis, uma vez que quanto maior o número de células mais formazana é produzida pelo metabolismo celular. Assim

ensaios de MTT podem determinar se os extratos ou compostos testados apresentam efeitos citotóxicos sobre as células.

A FIGURA 12 mostra que em nenhuma das concentrações testadas o extrato T-1 apresentou efeito citotóxico sobre os melanócitos, isto é, não provocou a morte celular. O que significa que o extrato T-1 apresentou a resposta farmacológica esperada sem apresentar efeito tóxico sobre as células.

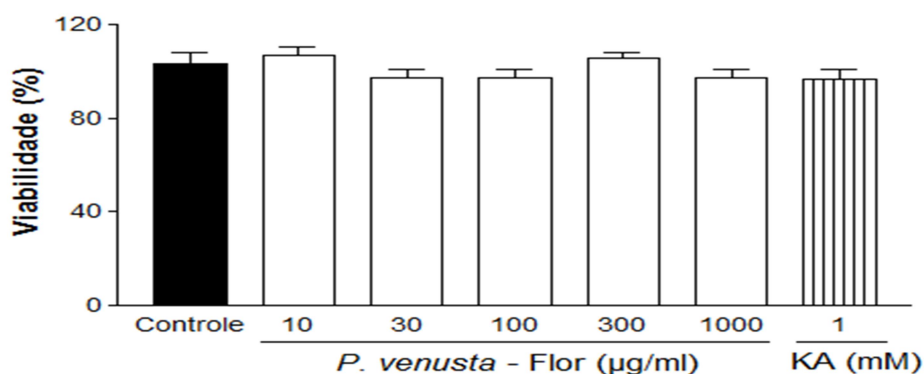


FIGURA 12 – AÇÃO DO EXTRATO DAS FLORES DE *P. venusta* NA VIABILIDADE DE MELANÓCITOS PELO ENSAIO DO MTT.

NOTA: Ácido kójico (KA) é o controle positivo

Conforme pode ser observado na FIGURA 13, todas as concentrações testadas do extrato T-2 (folhas) aumentaram a produção de melanina comparativamente ao controle. Estes resultados, vão de encontro a aqueles obtidos no ensaio de atividade da enzima tirosinase. Sendo que no ensaio somente com a enzima, todas as concentrações (300 a 2100 µg/mL) aumentaram a percentagem de oxidação da tirosina frente ao controle. Logo, o aumento da produção espontânea de melanina pode ser explicado pela ação estimuladora deste extrato sobre a enzima tirosinase. Em outras palavras, é possível inferir que o mecanismo pelo qual a melanogênese é estimulada se dá pela enzima tirosinase.

O ensaio de viabilidade celular de T-2 (FIGURA 14) mostra que nenhuma das concentrações testadas apresentou efeito tóxico sobre os melanócitos, isto é, o extrato T-2 não apresentou efeito citotóxico sobre os melanócitos. Este resultado demonstra que os compostos presentes em T-2, além de apresentarem a resposta farmacológica esperada, não são nocivos aos melanócitos.

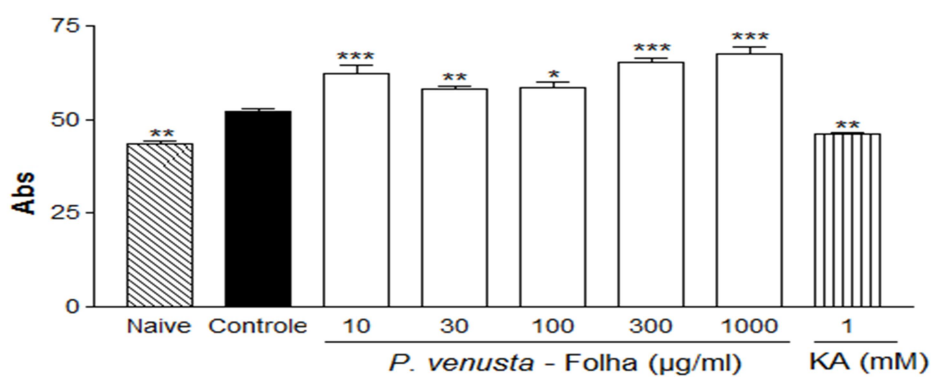


FIGURA 13 – AÇÃO DO EXTRATO (T-2) DAS FOLHAS DE *P. venusta* SOBRE A PRODUÇÃO DE MELANINA EM MELANÓCITOS B16F10.

LEGENDA: Ácido kójico (KA) é o controle positivo e os asteriscos mostram significância dos grupos em relação ao controle sendo \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$

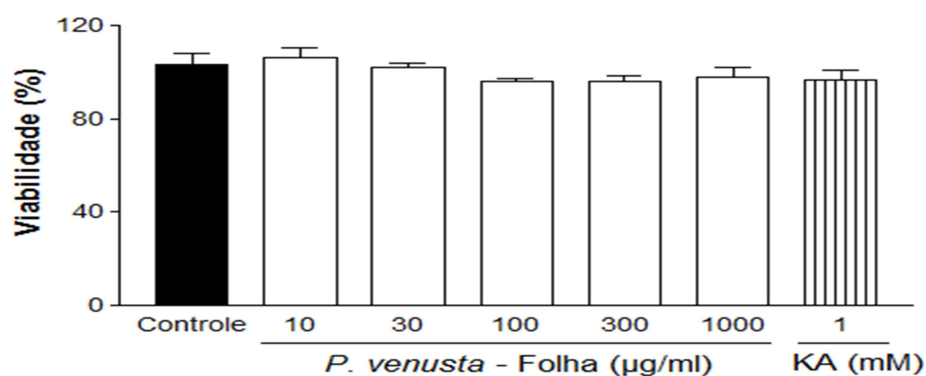


FIGURA 14 – AÇÃO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *P. venusta* (T-2) NA VIABILIDADE DE MELANÓCITOS PELO ENSAIO DO MTT.

NOTA: Ácido kójico (KA) é o controle positivo

O extrato T-3 (talos) apresentou aumento a produção espontânea de melanina somente na maior concentração testada (1000 µg/mL), enquanto para o extrato T-4 (raízes) nenhuma concentração testada estimulou a produção de melanina comparativamente ao controle (FIGURA 15).

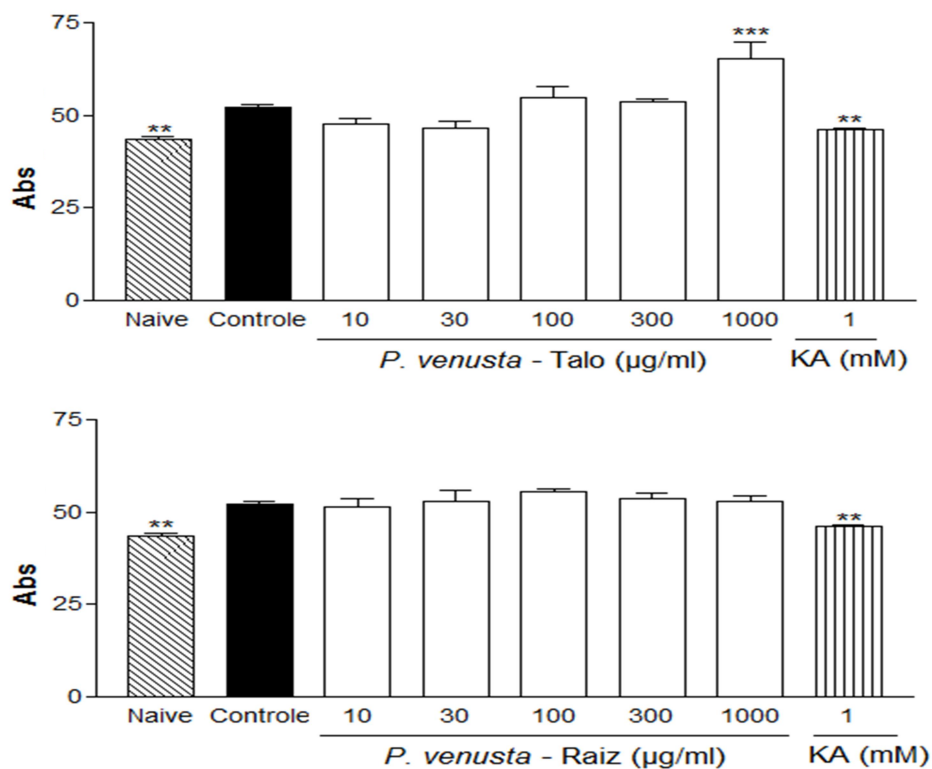
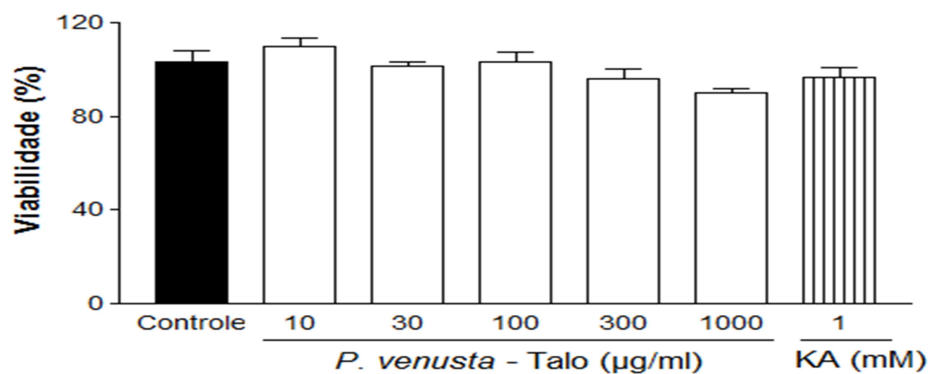


FIGURA 15 – AÇÃO DOS EXTRATOS (T-3) DOS TALOS E T-4 DAS RAÍZES DE *P. VENUSTA* SOBRE A PRODUÇÃO DE MELANINA EM MELANÓCITOS B16F10

LEGENDA: Ácido kójico (KA) é o controle positivo e os asteriscos mostram significância dos grupos em relação ao controle sendo \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$

No que diz respeito ao ensaio de viabilidade de melanócitos humanos, os extratos T-3 (talos) e T-4 (raízes) não apresentaram efeito citotóxico sobre a cultura de melanócitos nas concentrações de 10 a 1000 µg/mL (m/v) (FIGURA 16).



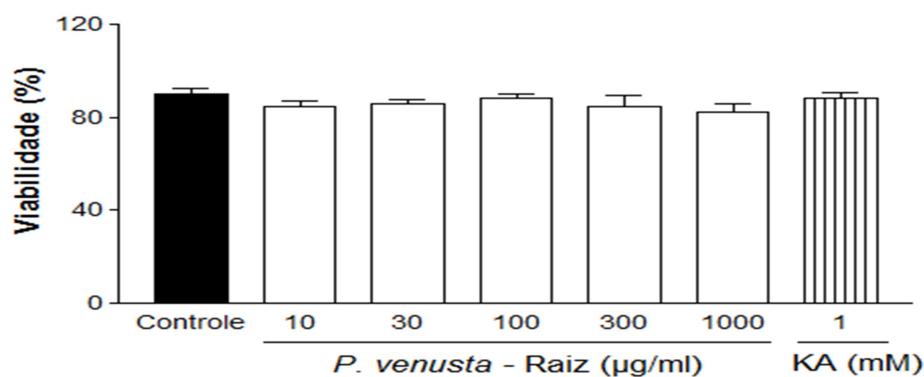


FIGURA 16 – AÇÃO DOS EXTRATOS DOS TALOS E RAÍZES DE *P. venusta*, T-3 E T-4, RESPECTIVAMENTE, NA VIABILIDADE DE MELANÓCITOS PELO ENSAIO DO MTT.

NOTA: Ácido kójico (KA) é o controle positivo

### 5.3 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS DE *P. venusta*

#### 5.3.1 Purificação dos extratos brutos (T-1, T-2 e T-4)

Primeiramente os extratos brutos, obtidos por turbólise, de *P. venusta* foram submetidos à separação em coluna de sílica gel sob vácuo, onde a separação acontece principalmente pela similaridade de polaridade da fase móvel usada na eluição dos compostos. Este tipo de fracionamento de extratos brutos foi empregado, com sucesso, em outros trabalhos (LIMA NETO *et al.*, 2008; DA SILVA *et al.*, 2001). O rendimento obtido a partir de 10 g de extrato bruto para cada parte da planta consta na TABELA 3.

TABELA 3 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DA CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO EM COLUNA

Parte da planta	Massas obtidas das frações			
	Hexano	Acetato	Etanol	Metanol
Flores	0,05 g	0,11 g	2,02 g	7,67 g
Folhas	0,08 g	0,57 g	4,58 g	4,67 g
Raízes	0,06 g	0,20 g	3,85 g	5,89 g



O fracionamento das flores de *P. venusta* apresentou o maior rendimento nas frações mais polares: etanólica (20,2%) e metanólica (76,7%), com pequena contribuição da fração acetato de etila (1,1%). As folhas de *P. venusta*, apresentaram rendimentos praticamente equitativos entre as frações majoritárias: etanólica (45,8%) e metanólica (46,7%) e 5,7% da fração acetato de etila. No que diz respeito às raízes de *P. venusta*, a fração metanólica apresentou, assim como nas folhas, rendimento majoritário (58,9%), seguido da fração etanólica (38,5%) e acetato de etila (2,0%).

É importante notar que, na TABELA 3, os talos de *P. venusta* não estão presentes porque não foram fracionados. Isso se deve ao fato de que, as análises realizadas previamente com todas as partes da planta (RMN-H, CCD e polifenóis), indicaram que os talos apresentaram composição química similar às folhas, entretanto, com concentração de metabólitos consideravelmente inferior. Além disso, o ensaio farmacológico de produção de melanina *in vitro* indicou atividade somente da maior concentração testada deste extrato. Já para as folhas, em todas as concentrações testadas houve atividade.

### 5.3.2 ANÁLISES DAS FRAÇÕES ETANÓLICA E METANÓLICA POR RMN

Os experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC foram realizados com as frações, etanólica e metanólica a 90%, das flores e raízes de *P. venusta* com objetivo de identificar compostos diretamente nas frações.

Da fração etanólica das flores foi possível identificar três compostos: alantoína (P-1), verbascosídeo (FLETOH-9) e rutina (FLETOH-12). Na fração metanólica das flores (FLMeOH) apenas o verbascosídeo pode ser observado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , a despeito do maior rendimento desta fração oriunda da coluna por adsorção em coluna (TABELA 3).

Da fração etanólica das raízes foi possível identificar dois compostos: alantoína e verbascosídeo. Na fração metanólica das raízes (RMeOH), assim como na FLMeOH, apenas o verbascosídeo foi identificado nos espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .

Vale ressaltar, que estes resultados evidenciam que a RMN é uma poderosa ferramenta para caracterização de compostos mesmo em amostras de composição química complexa.

Uma vez que as análises por RMN 1D e 2D das frações FLETOH e FLMEOH (flores) e RETOH e RMEOH (raízes) possibilitaram a identificação de uma hidantoína, um flavonóide e um feniletanóide glicosídico, partiu-se para o desenvolvimento de métodos analíticos por CLAE para posterior isolamento dos compostos presentes nestas frações. Os dados espectrais e demais informações que permitiram a caracterização de verbascosídeo, rutina e alantoína encontram-se detalhadas nos itens 5.3.4.1, 5.3.4.2 e 5.4, respectivamente.

### 5.3.3 Análises por CLAE das frações polares de flores, folhas e raízes

#### 5.3.3.1 Desenvolvimento do método analítico para identificação e separação dos compostos fenólicos das flores, folhas e raízes de *P. venusta*

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em fase reversa, foi a ferramenta analítica escolhida para a separação dos compostos presentes nas flores, folhas e raízes, uma vez que os maiores rendimentos das frações provenientes da cromatografia em coluna de adsorção em sílica gel sob vácuo (TABELA 3) foram observados para as frações etanólicas e metanólicas.

A CLAE foi empregada por ser uma técnica de aplicabilidade praticamente universal, reprodutível, rápida, comumente empregada e aplicada na indústria farmacêutica e que permite monitoramento on-line dos analitos por meio da hifenação CLAE-detector de arranjo de diodos (DAD) (SNYDER *et al.*, 2010).

Inicialmente, foram testados diferentes métodos analíticos para separação dos compostos baseando-se em metodologias analíticas para flavonóides e compostos fenólicos (CHRISTOPHORIDOU *et al.*, 2005; VUKICS *et al.*, 2006, HASLER *et al.*, 1989).

O desenvolvimento do método analítico por CLAE considerou, as seguintes etapas: escolha das condições iniciais de trabalho, escolha da composição e/ou percentagem da fase móvel para que os analitos estivessem

compreendidos entre:  $1 \leq k \leq 10$ ; ajuste das condições cromatográficas para a melhora na eficiência, resolução e seletividade da separação.

Diferentes composições de fase movel isocraticas e gradientes foram testados a fim de estabelecer condições ótimas de separação da complexa mistura de compostos presentes nas frações. Dois sistemas de fase movel foram inicialmente testados para a separação dos compostos: o primeiro sistema testado tinha como fase móvel uma solução 0,1% TFA em água ultra-pura e acetonitrila em um gradiente linear com tempo de corrida de 40 minutos (CHRISTOPHORIDOU *et al.*, 2005). Os resultados obtidos não foram satisfatórios em termos dos parâmetros cromatográficos avaliados tais como: eficiencia, resolução e seletividade (FIGURA 17).

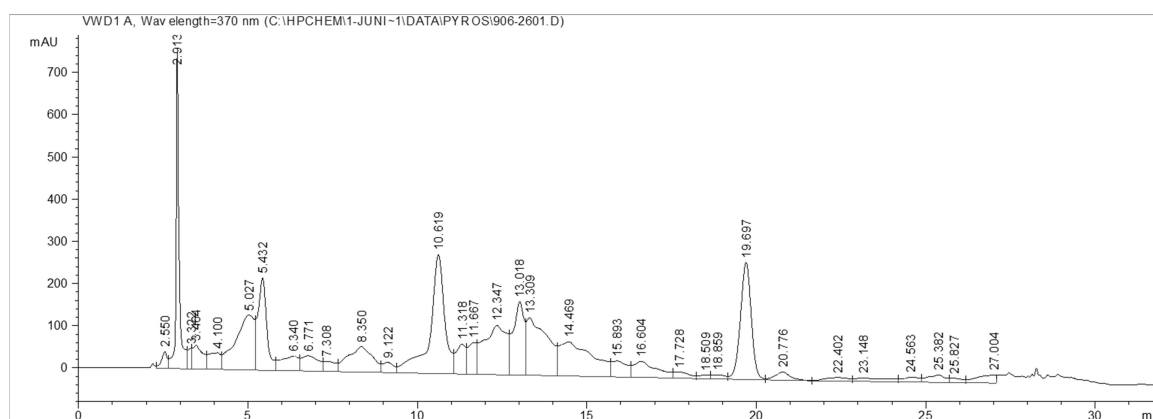


FIGURA 17 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA SUBFRAÇÃO ETANÓLICA DE FLORES DE *P. VENUSTA* COM 0,1% TFA EM ÁGUA E ACN COMO FASE MÓVEL E DETECÇÃO A 370 NM

O segundo sistema de solventes testado foi composto por 0,5 % de ácido fosfórico e metanol (43/57 v/v) com gradiente de eluição com tempo total de corrida de 35 minutos (VUKICS *et al.*, 2006). Nestas condições, o perfil cromatográfico das flores, folhas e raízes melhorou sensivelmente em termos de seletividade da separação (FIGURA 18). No entanto, o ácido fosfórico por não ser volátil apresentou grande interferência na identificação dos compostos por RMN de  $^1\text{H}$ , fazendo com que a utilização deste ácido, na porção aquosa da fase móvel, fosse descartada. Esta melhora em termos de seletividade de separação, utilizando metanol como eluente orgânico da fase móvel, já fora relatada anteriormente por Vukics *et al.* (2006).

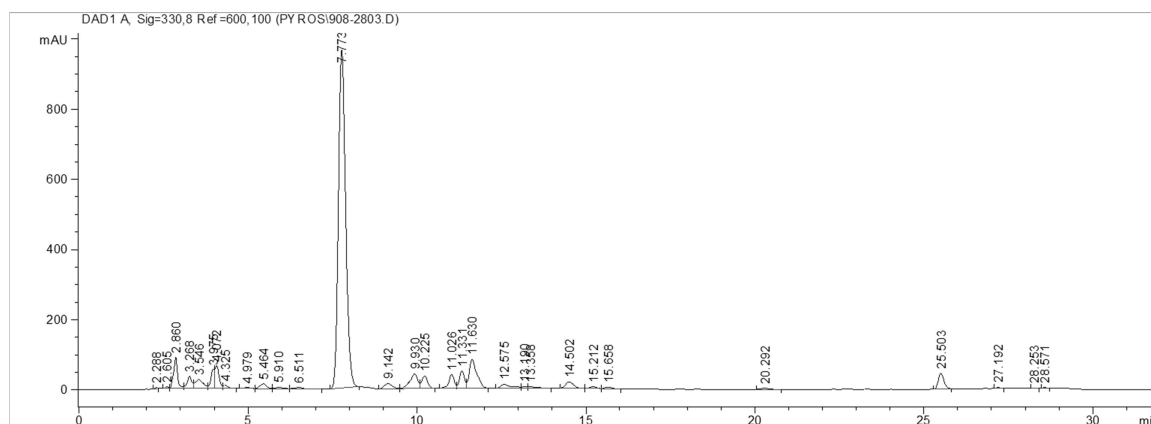


FIGURA 18 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA SUBFRAÇÃO ETANÓLICA DE FLORES DE *P. VENUSTACOM* FASE MÓVEL 0,5% ÁCIDO FOSFÓRICO E METANOL E DETECÇÃO A 330 NM

Como consequência, o ácido fórmico foi empregado como o modificador de pH da porção aquosa da fase móvel, uma vez que, esse ácido orgânico é volátil e não demonstrou nenhuma interferência na análise de RMN de  $^1\text{H}$  dos compostos isolados por CLAE. A acidificação da fase móvel é importante porque evita a ionização dos compostos fenólicos mantendo-os, na sua forma associada e, com isso, são obtidos picos mais finos e simétricos e, consequentemente melhora da eficiência de separação. Além disso, o pH ácido da fase móvel exerce um efeito supressor sobre a ionização dos grupos silanóis da fase estacionária da coluna  $\text{C}_{18}$ , evitando, dessa forma, interações indesejadas entre analitos e silanóis (SNYDER *et al.*, 2010).

Com relação à porção orgânica da fase móvel, quando foi utilizado somente metanol a separação apresentou boa seletividade entre os compostos, entretanto, a resolução dos picos de tempos de retenção 5,721 e 5,960 minutos e 10,010 e 10,326 (FIGURA 19 A) foram inferiores a 0,9. A resolução foi melhorada (superior 1,5) quando com metanol e THF foram utilizados. Por esse motivo o THF foi utilizado como eleunte orgânico da fase móvel juntamente com o metanol e a proporção entre estes dois solventes que apresentou os melhores resultados foi de 10:90 (v/v) (FIGURA 19 B).

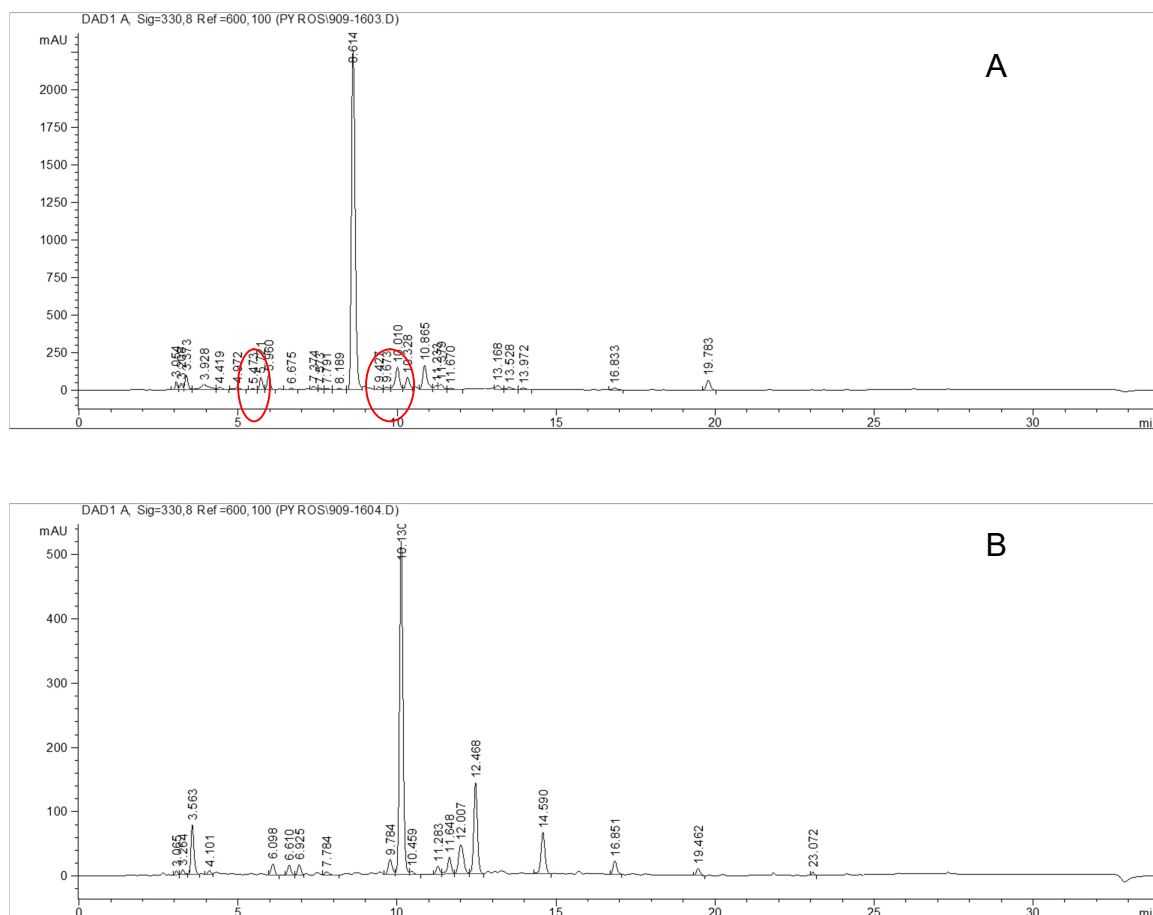


FIGURA 19 – CROMATOGRAMAS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DA FRAÇÃO ETANÓLICA DAS FLORES (FLETOH) COM DETECÇÃO A 330 NM

LEGENDA: A – Modificador orgânico metanol; B – Modificador orgânico solução metanol:THF (90:10, v/v)

O efeito da temperatura da coluna sobre a seletividade e resolução da separação nas amostras de flores de *P. venusta* também foi investigado. O aumento da temperatura da coluna, mantidas as outras condições do método analítico, não apresentou mudanças significativas na eficiência da separação, entretanto, apresentou impacto mais significativo no fator retenção ( $k$ ) dos analitos presentes nesta amostra. O método analítico desenvolvido foi empregado com boa eficiência para a coluna X-Terra. Além dessa coluna analítica outras colunas foram testadas com objetivo de investigar outras possibilidades de fase estacionária, seja com seletividade similar a X-Terra ou com seletividade diferente, mas com resolução superior.

Os cromatogramas da fração FLETOH mostram não haver ganhos significativos em termos de resolução ou mesmo grandes mudanças em termos de seletividade nas separações empregando-se três colunas de diferentes fabricantes (FIGURA 20).

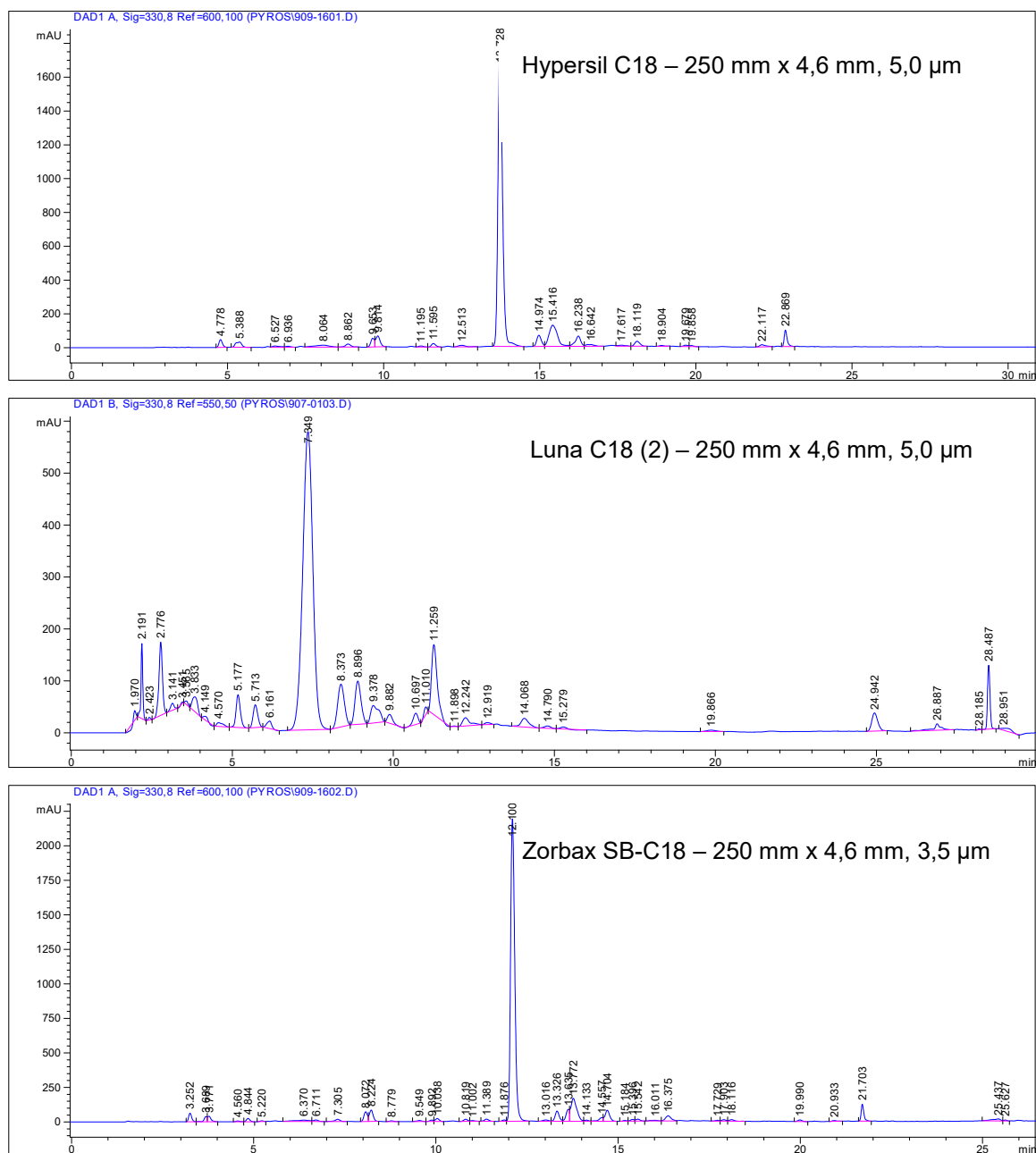


FIGURA 20 – COMPARAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO EM COLUNAS C<sub>18</sub> DE DIFERENTES FABRICANTES PARA SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM FLETOH COM DETECÇÃO A 330 NM

### 5.3.3.2 Escolha das frações polares de flores, folhas e raízes que foram fracionadas por CLAE semi-preparativa

As frações polares (etanólica e metanólica 90%) de flores, folhas e raízes foram avaliadas sob dois aspectos: perfil cromatográfico por CLAE para compostos fenólicos ou flavonóides e análise por RMN de  $^1\text{H}$  que, diferentemente da CLAE, fornece um perfil espectral dos metabólitos de forma não seletiva e que tem provado ser valioso na prospecção de novas moléculas em misturas complexas como fitoterápicos e plantas medicinais (AGNOLET *et al.*, 2010).

Os perfis cromatográficos das frações etanólica e metanólica das flores foram avaliados em vários comprimentos de onda compreendidos entre 210 e 400 nm. A análise comparativa destes *fingerprints* em diferentes comprimentos de onda demonstrou que estes eram sobreponíveis e ainda que a fração etanólica apresentou um perfil cuja intensidade dos picos cromatográficos era claramente superior à fração metanólica 90 %, portanto, não seria necessário dar continuidade com esta fração.

Além disso, a análise comparativa por RMN de  $^1\text{H}$  das duas frações (FIGURA 21) também seguiu a mesma tendência, isto é, equivalência qualitativa entre os sinais, portanto, a fração metanólica apesar de apresentar um alto rendimento (TABELA 03) revelou menor concentração de metabólitos sendo, conseqüentemente, a fração etanólica das flores a escolhida para o fracionamento.

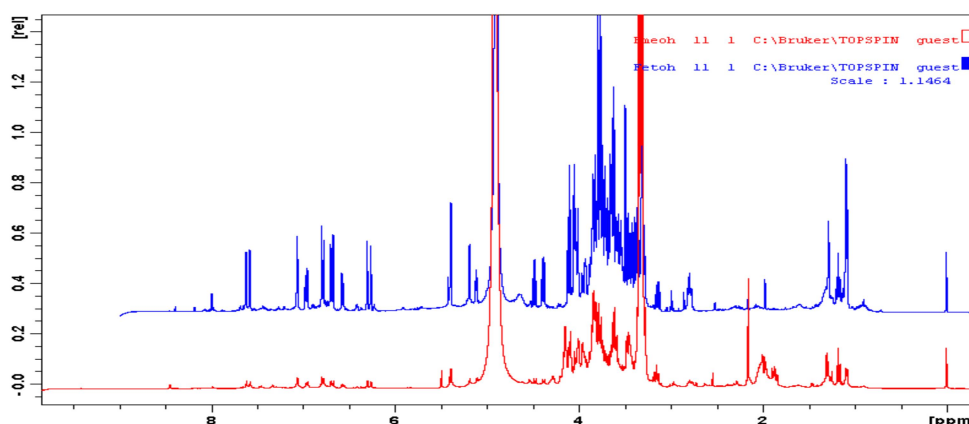


FIGURA 21 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS RMN DE  $^1\text{H}$  DAS FRAÇÕES ETANÓLICA (AZUL) E METANÓLICA (VERMELHO) DAS FLORES DE *P. venusta*.

Situação análoga foi observada com as frações das folhas de *P. venusta*, entretanto, ao contrário do que foi observado com as flores, a fração cujo perfil cromatográfico apresentou picos mais intensificados foi a fração metanólica 90%. Desta forma, a fração metanólica 90% das folhas foi fracionada por CLAE semi-preparativa (FIGURA 22).

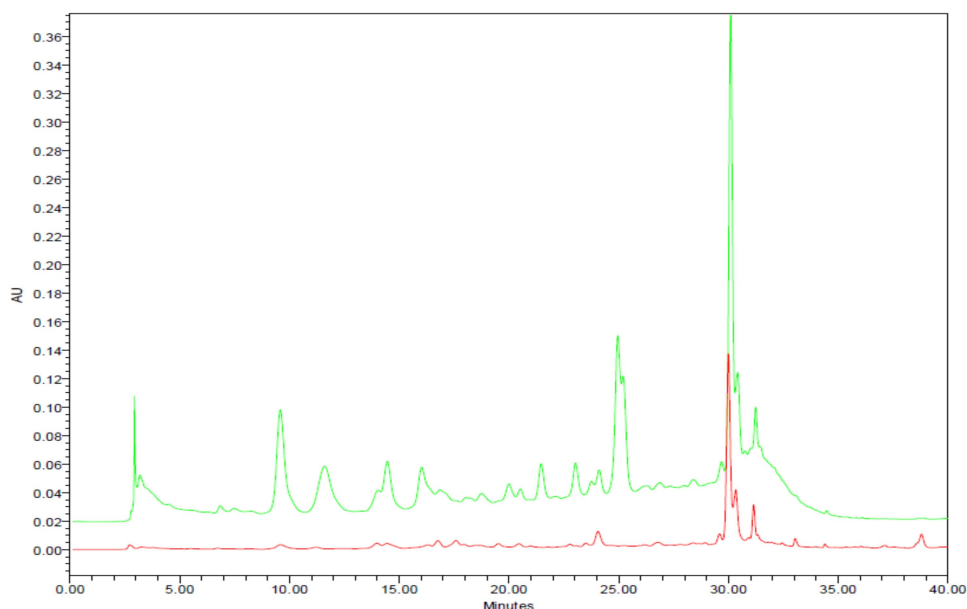


FIGURA 22 – SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS ADQUIRIDOS A 330 NM, DAS FRAÇÕES ETANÓLICA (VERMELHO) E METANÓLICA (VERDE) DAS FOLHAS DE *P. venusta*.

No que diz respeito às raízes de *P. venusta*, a fração escolhida para fracionamento via CLAE foi a etanólica. Isso se deve a comparação dos perfis espectrais das frações etanólica e metanólica 90%, que evidenciou maior intensidade dos sinais, especialmente na região de hidrogênios aromáticos, na fração etanólica (FIGURA 23).



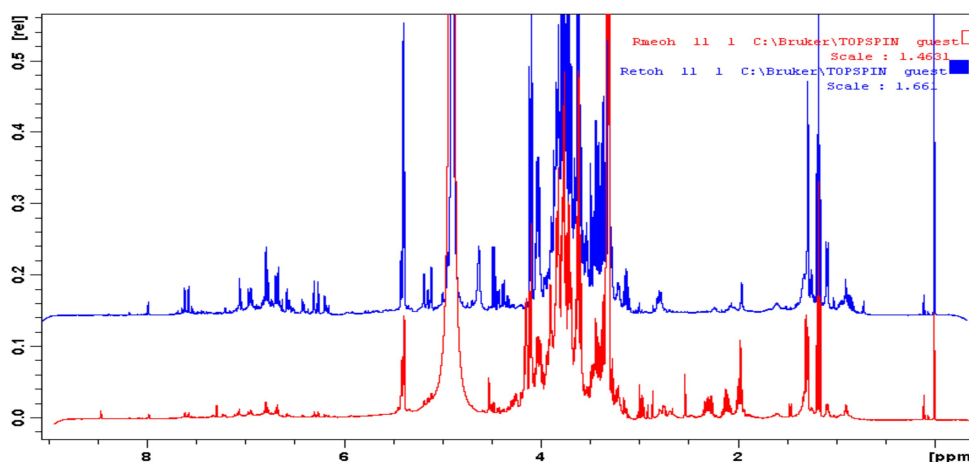


FIGURA 23 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS RMN DE  $^1\text{H}$  DAS FRAÇÕES ETANÓLICA (AZUL) E METANÓLICA 90% (VERMELHO) DAS RAÍZES DE *P. venusta*.

#### 5.3.3.3 Transferência do método analítico para a escala semi-preparativa

Uma vez definidas as condições cromatográficas para a separação em escala analítica foi realizada a transposição do método para a escala semi-preparativa e, para tanto, os seguintes fatores foram levados em consideração: a sobrecarga da coluna cromatográfica, fluxo da fase móvel, volume de injeção e otimização das condições de coleta das frações.

Tomando-se em conta as dimensões da coluna semi-preparativa, a solubilidade da amostra e também a capacidade de injeção do sistema cromatográfico (volume máximo de injeção), a sobrecarga da coluna semi-preparativa foi feita com concentração das amostras (flores = 40,5 mg/mL; folhas = 49,3 mg/mL; raízes = 52,0 mg/mL) e volume de 250  $\mu\text{L}$ . A dissolução das amostras foi feita em uma solução contendo 23% metanol/THF (90:10) e 73% de uma solução de ácido fórmico 0,1% (v/v). A escolha dessa proporção de solventes foi utilizada devido à importância de garantir a dissolução da amostra com, no máximo, a quantidade de solvente orgânico da composição inicial do gradiente de eluição. Pois, de outro modo, existe a possibilidade de precipitação de compostos na cabeça da coluna e, à medida que aumenta a proporção de solvente orgânico ao longo do desenvolvimento do gradiente, os precipitados poderiam ser dissolvidos durante a corrida cromatográfica o que, em última análise, afetaria diretamente a eficiência da separação. Portanto, no que diz respeito à sobrecarga da coluna cromatográfica foram utilizadas

concomitantemente duas abordagens normalmente aceitas: sobrecarga de volume e concentração das amostras (HUBER & MAJORS, 2004).

Para o cálculo do volume máximo de injeção e do fluxo de fase móvel foram empregadas as seguintes equações:

$$\frac{V_1}{V_2} = \frac{r_1^2}{r_2^2} \quad \text{(Equação 1);}$$

Onde:

$V_1$  = é o fluxo das coluna analítica (1,0 mL/min);

$V_2$  = é o fluxo da coluna semi-preparativa (?);

$r_1$  e  $r_2$  = raios das colunas analítica e semi-preparativa (4,6 mm e 9,4 mm, respectivamente).

$$\frac{x_1}{\pi \times r_1^2} = \frac{x_2}{\pi \times r_2^2} = \frac{1}{C_L} \quad \text{(Equação 2).}$$

Onde:

$x_1$  = volume máximo de injeção da coluna analítica (41,5  $\mu$ L);

$x_2$  = volume máximo de injeção da coluna semi-preparativa (?);

$r_1$  e  $r_2$  = raios das colunas analítica e semi-preparativa (4,6 mm e 9,4 mm, respectivamente).

$C_L$  = razão dos comprimentos das colunas (1,2).

O objetivo do cálculo do fluxo de fase móvel na coluna semi-preparativa é manter o tempo de corrida e o tempo de retenção dos compostos, de acordo com o que foi desenvolvido para a coluna analítica e o cálculo do volume máximo de injeção é uma medida da capacidade da coluna frente ao volume injetado, mantendo-se parâmetros importantes na separação como a resolução cromatográfica. A coleta de frações foi testada e otimizada e os melhores resultados, em termos de pureza dos compostos isolados, foram obtidos quando cada pico foi coletado individualmente.

#### 5.3.3.4 Fracionamento dos compostos presentes nas frações polares de flores e folhas de *P. venusta* por CLAE semi-preparativa

Das 15 frações obtidas por CLAE semi-preparativa, no fracionamento da fração etanólica das flores, quatro compostos foram destacados no cromatograma (FIGURA 24). O pico com TR = 16,49 min. (FLETOH-9) apresentou um perfil espectral com absorção máxima em 332,1 nm, o pico com TR = 21,71 min. (FLETOH-12) com absorção máxima em 353,7 nm, o pico com TR = 22,72 min. (FLETOH-13) com absorção máxima em 347,7 nm e o pico com TR = 23,79 min. (FLETOH-14) com absorção máxima em 338,1 nm, todos com perfis espectrais característicos de flavonóides, conforme observado na FIGURA 24.

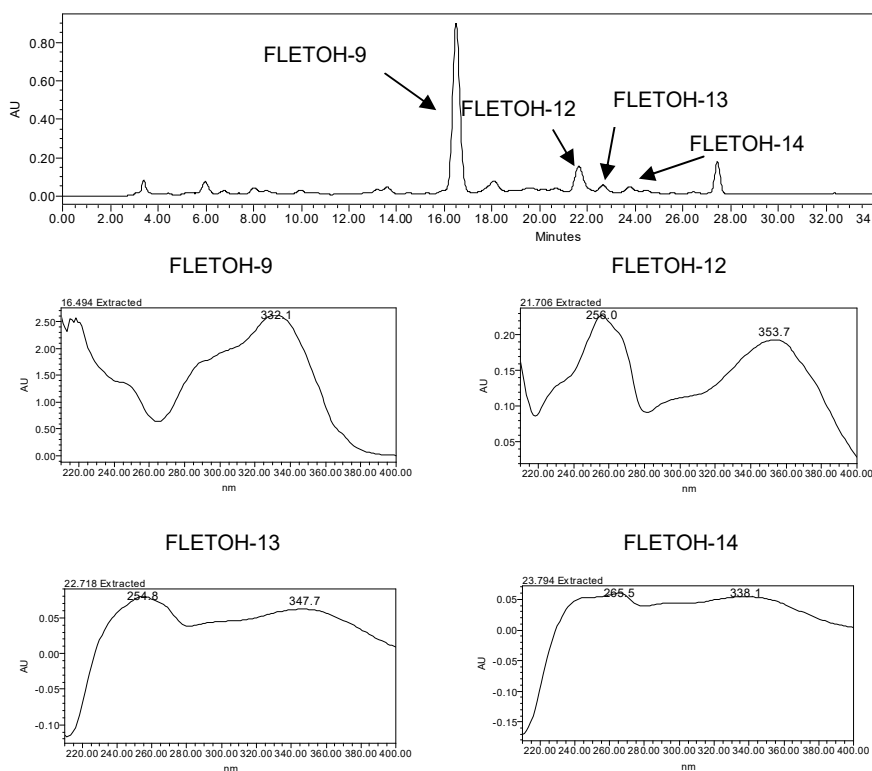


FIGURA 24 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE DE FLETOH E OS ESPECTROS DE UV DOS COMPOSTOS ISOLADOS

NOTA: TR = 16,49 MIN (FLETOH-9), TR = 21,71 MIN. (FLETOH-12), TR = 22,72 MIN. (FLETOH-13), TR = 23,79 MIN. (FLETOH-14)

Das 11 frações obtidas por CLAE semi-preparativa, no fracionamento da fração metanólica das folhas, um composto foi destacado no cromatograma (FIGURA 25). O pico com TR = 22,16 min. (FOMeOH-9) apresentou um perfil espectral com absorção máxima em 356 nm.

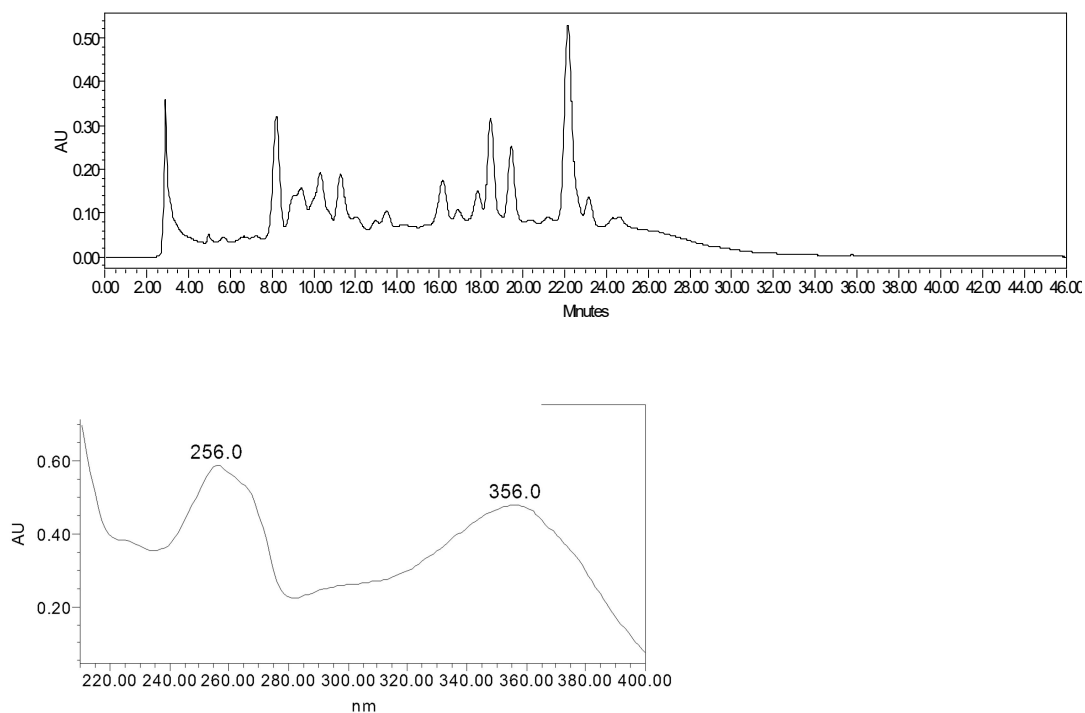
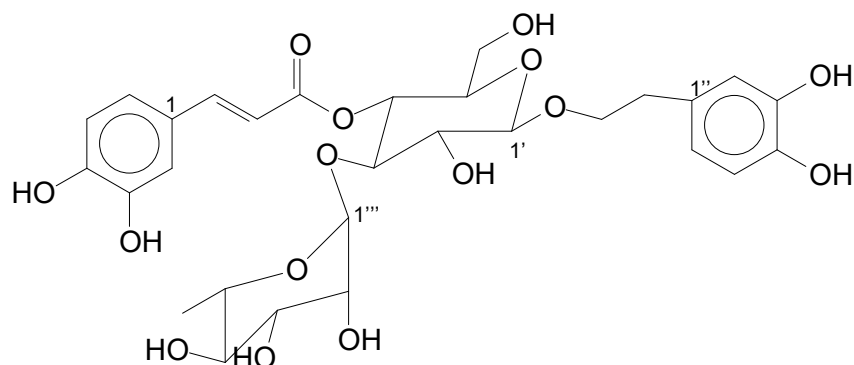


FIGURA 25 – CROMATOGRAMA (ACIMA) OBTIDO POR CLAE DE FOMEOH E ESPECTRO DE UV-VIS (ABAIXO) DO COMPOSTO ISOLADO

NOTA: TR = 22,16 MIN (FOMEOH-9)

### 5.3.4 Caracterização dos compostos majoritários da fração etanólica das flores

#### 5.3.4.1 Elucidação estrutural de Verbascosídeo



Da fração etanólica das flores de *P. venusta* foram isolados, por CLAE semi-preparativa, 44,5 mg de um composto codificado como FLETOH-9 que se apresentou como um sólido marrom solúvel em metanol, água, acetona e DMSO.

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 26) mostrou a presença de sinais de hidrogênios aromáticos em  $\delta$  6,70 (d,  $J=1,9$  Hz, H2''), 6,68 (d,  $J=8,1$  Hz, H5'') e 6,57 (d,  $J=8,1$  e  $1,9$  Hz, H6'') atribuídos aos hidrogênios 2'', 5'', 6'' da unidade 3',4'-diidróxifenil aglicona. Os sinais  $\delta$  7,06 (d,  $J=1,9$  Hz, H2), 6,78 (d,  $J=8,2$  Hz, H5) e 6,96 (d,  $J=8,2/1,9$  Hz, H6) foram conferidos a unidade cafeoíla da molécula. Estas duas unidades da molécula demonstraram o mesmo padrão de acoplamento entre os hidrogênios meta e orto, o que confirmou o fato de que se tratava de dois anéis aromáticos do tipo 1,3,4-trissubstituídos.

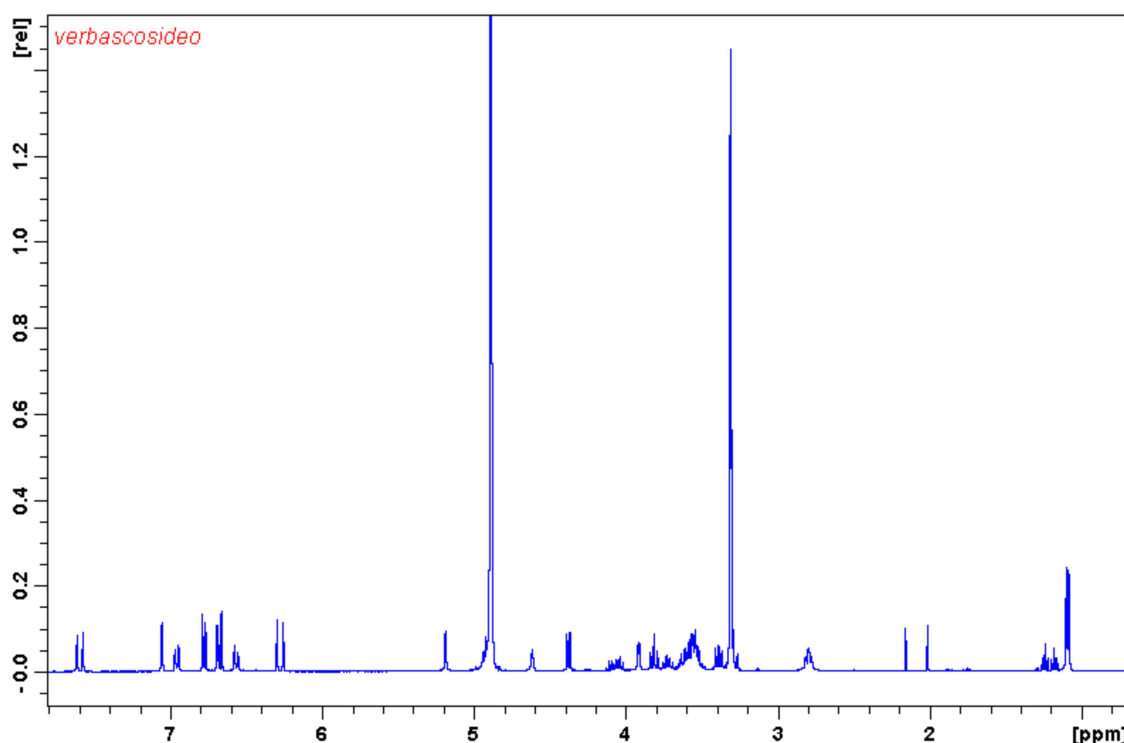


FIGURA 26 – ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  DE VERBASCOSÍDEO (MeOD, 400 MHz)

Os sinais que faltavam para a caracterização da unidade aglicona da molécula FLETOH-9 foram visualizados em  $\delta$  2,79 um multipletto referente aos hidrogênios de H-7'' e em  $\delta$  3,72 um multipletto dos hidrogênios de H-8''.

Ainda com relação ao espectro de hidrogênio, foram observados sinais em  $\delta$  7,60 (d,  $J=15,9$  Hz, H-7) e 6,28 (d,  $J=15,9$  Hz, H-8) dos hidrogênios da ligação dupla do sistema  $\alpha$ - $\beta$  insaturado. A constante de acoplamento de 15,9 Hz indicou configuração *trans* dos hidrogênios da ligação dupla.

Os resíduos de açúcares,  $\beta$ -glucose e  $\alpha$ -ramnose, foram caracterizados pela presença dos hidrogênios anoméricos em  $\delta$  4,38 (d,  $J=7,9$  Hz, H-1') e 5,18 (d,  $J=1,5$  Hz, H-1'''), respectivamente. A configuração dos açúcares foi evidenciada pela análise das constantes de acoplamento. A presença de hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,09 (d,  $J=6,2$  Hz, H-6''') também foi importante para a caracterização da unidade glicosídica ramnose. O deslocamento químico do hidrogênio em  $\delta$  4,92 (d,  $J=9,4$  Hz, H-4') sugeriu a ligação do C-4 da glucose com a unidade cafeoíla. Os demais hidrogênios de açúcares apresentaram deslocamento químico entre  $\delta$  3,33 a 4,05 como multipletos.

O experimento de HSQC (FIGURA 27) revelou algumas importantes correlações que possibilitaram confirmar a presença dos resíduos de açúcares  $\beta$ -

glucose e  $\alpha$ -ramnose. Entre as quais, pode-se citar a correlação entre os carbonos anoméricos em  $\delta_C$  102,8 (C-1') e  $\delta_H$  5,18 para a ramnose e  $\delta_C$  104,0 (C-1) e  $\delta_H$  4,38 para a glucose.

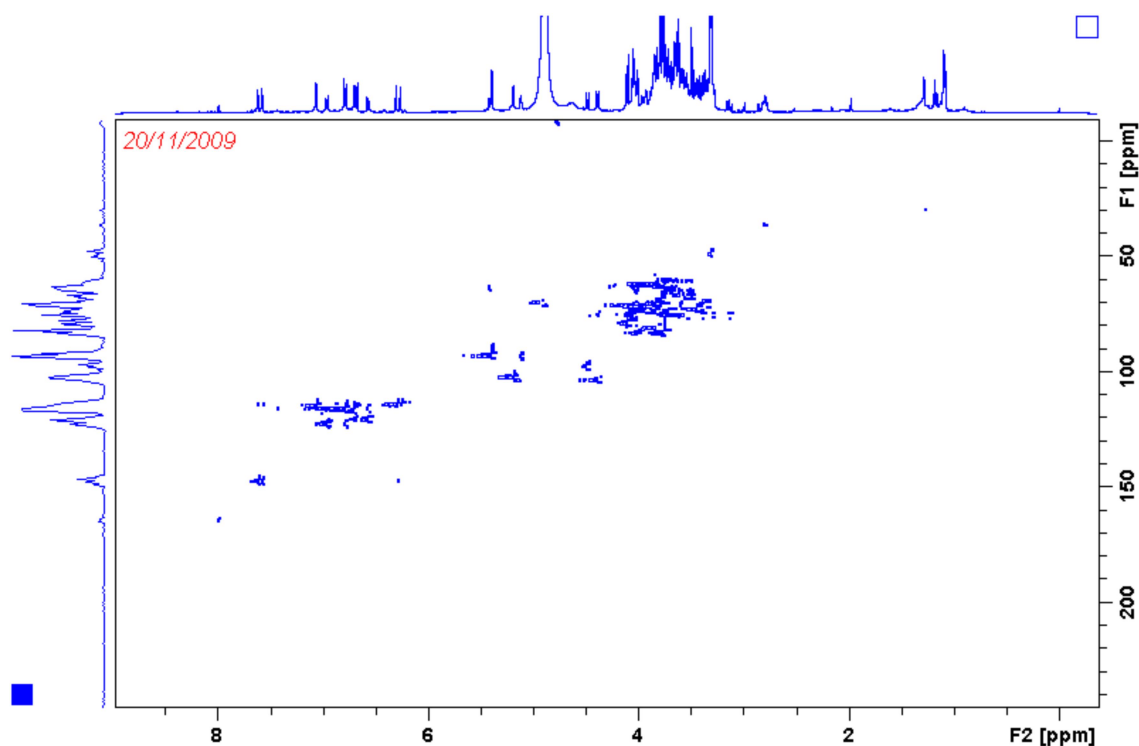


FIGURA 27 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  (HSQC) DA FRAÇÃO ETANÓLICA DAS FLORES DE *P. venusta*.

O posicionamento das unidades glicosídicas foi evidenciado pelo experimento de HMBC (FIGURA 28) por meio das seguintes correlações:  $\delta_H$  5,18 (H-1''', ramnose) e  $\delta_C$  81,5 (C-3', glucose) que caracterizou a ligação do tipo 1 $\rightarrow$ 3 entre os dois resíduos de açúcares e o hidrogênio anomérico da glucose  $\delta_H$  4,38 (H-1',) com o carbono metilênico  $\delta_C$  72,1 (C-8'') da unidade 3,4-diidroxifeniletóxila.

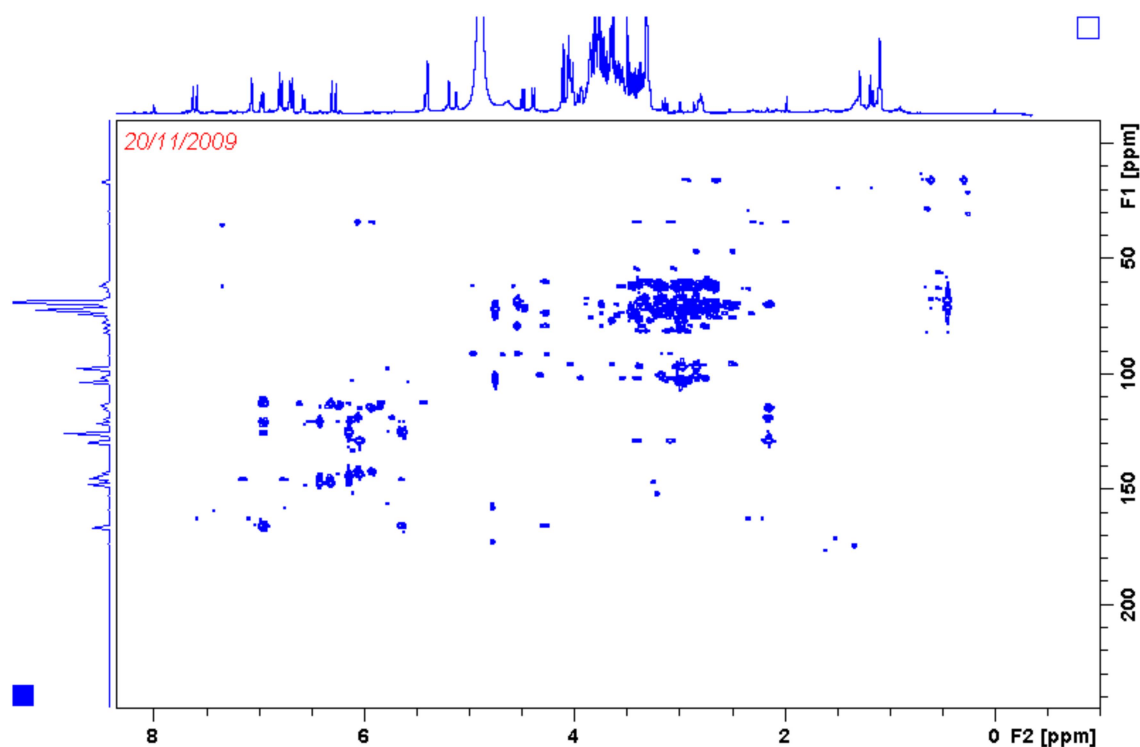


FIGURA 28 – MAPA DE CORRELAÇÃO  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  A LONGA DISTÂNCIA (HMBC) DA FRAÇÃO ETANÓLICA DAS FLORES DE *P. venusta*.

Com base nos dados espectrais obtidos e comparação com aqueles da literatura (ANDARY, *et al.*, 1982) foi possível concluir que o composto presente na fração FLETOH-9 trata-se do verbascosídeo (acteosídeo) ou  $[\beta\text{-(3',4'-diidroxifenil)etil-O-}\alpha\text{-ramnopiranosil(1'}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-(4-O-cafeoil)-glucopiranosídeo}]$  (TABELA 4). É a primeira vez que o verbascosídeo é relatado no gênero *Pyrostegia*, em particular, na espécie *P. venusta*.



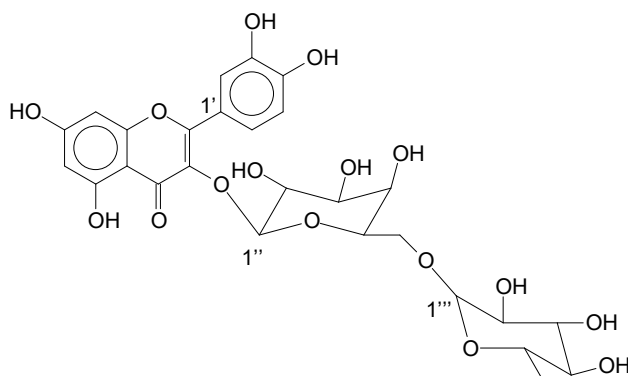
TABELA 4 – DADOS DE RMN DO COMPOSTO FLETOH-9 E VERBASCOSÍDEO\*.

Posição	FLETOH-9 (MeOD)		Verbascosídeo (DMSO-d <sub>6</sub> +CF <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H)*	
	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$
1	-	127,4	-	127,7
2	7,06 (d, J=1,9 Hz)	115,1	7,09 (d, J=2,1 Hz)	115,2
3	-	149,6	-	149,7
4	-	146,5	-	146,8
5	6,78 (d, J=8,2 Hz)	123,1	6,79 (d, J=8,1 Hz)	116,5
6	6,96 (dd, J=8,2 e 1,9 Hz)	126,1	6,99 (dd, J= 8,2 e 2,1 Hz)	123, 2
7	6,28(d, J=15,9 Hz)	114,4	6,35 (d, J=15,9 Hz)	114,7
8	7,60 (d, J=15,9 Hz)	147,9	7,57 (d, J=15,9 Hz)	148,0
9	-	168,1	-	168,3
1''	-	131,3	-	131,5
2''	6,70 (d, J=1,9 Hz)	116,9	6,72 (d, J=2,1 Hz)	117,1
3''	-	145,9	-	144,6
4''	-	144,6	-	146,1
5''	6,68 (d, J=8,1 Hz)	116,2	6,69 (d, J=8,1 Hz)	116,3
6''	6,57 (dd, J=8,2 e 1,9 Hz)	121,1	6,57 (dd, J= 8,1 e 2,1 Hz)	123,3
7''	2,79 (tl, J=7,3 Hz)	36,3	2,78 (m)	36,5
8''	3,72 (m)	72,1	3,70 / 4,08 (m)	72,2
1' – Gluc.	4,38 (d, J=7,9 Hz)	104,0	4,33(d, J= 7,8 Hz)	104,2
2'	3,32 (dd, J=7,5 e 9,0 Hz)	75,9	3,71 (m)	76,2
3'	3,78 (t, J=9,0 Hz)	81,5	3,70 (t)	81,6
4'	4,92 (dd, J=9,4 Hz)	70,4	4,92 (t, J=9,5 Hz)	70,4
5'	3,41 (m)	75,8	3,38 (m)	76,0
6'	3,54/3,61 (m)	62,2	3,54 / 3,68 (m)	62,4
1''' – Ram.	5,18 (d, J=1,5 Hz)	102,8	5,03 (d, J=1,8 Hz)	103,0
2'''	3,90 (m)	71,8	3,70 (dd, J= 1,0 e 2,5 Hz)	72,3
3'''	3,44 (m)	71,2	3,30 (m)	72,0
4'''	3,32 (m)	73,6	3,43 (m)	73,8
5'''	3,38 (m)	70,3	3,12 (t, J=9,5 Hz)	70,6
6'''	1,09 (d, J=6,2 Hz)	18,3	1,05 (d, J= 6,0 Hz)	18,4

FONTE: \*ANDARY (1982).

Diversas propriedades biológicas foram atribuídas ao verbascosídeo na literatura, tais como antioxidante (WONG *et al.*, 2001; OBIED *et al.*, 2008; VASSILIKI & TSIMIDOU, 2009); citoprotetora ( SHENG *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2003; PU *et al.*, 2003; FUNES *et al.*, 2009); antiproliferativa (PETTIT *et al.*, 1990; ABE *et al.*, 2002; OBIED *et al.*, 2008) antimetastásica (OHNO *et al.*, 2002) e antiinflamatória (SCHAPOVAL *et al.*, 1998).

#### 5.3.4.2 Elucidação estrutural de Rutina



Da fração etanólica das flores de *P. venusta* foram isolados, por CLAE semi-preparativa, 20,5 mg de um composto codificado como FLETOH-12 que se apresentou como um sólido amarelo solúvel em metanol. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de FLETOH-12 foi totalmente sobreponível, com aquele do padrão de rutina, o que é um indicativo de que o isolamento via CLAE resultou em um composto de considerável pureza (FIGURA 29).

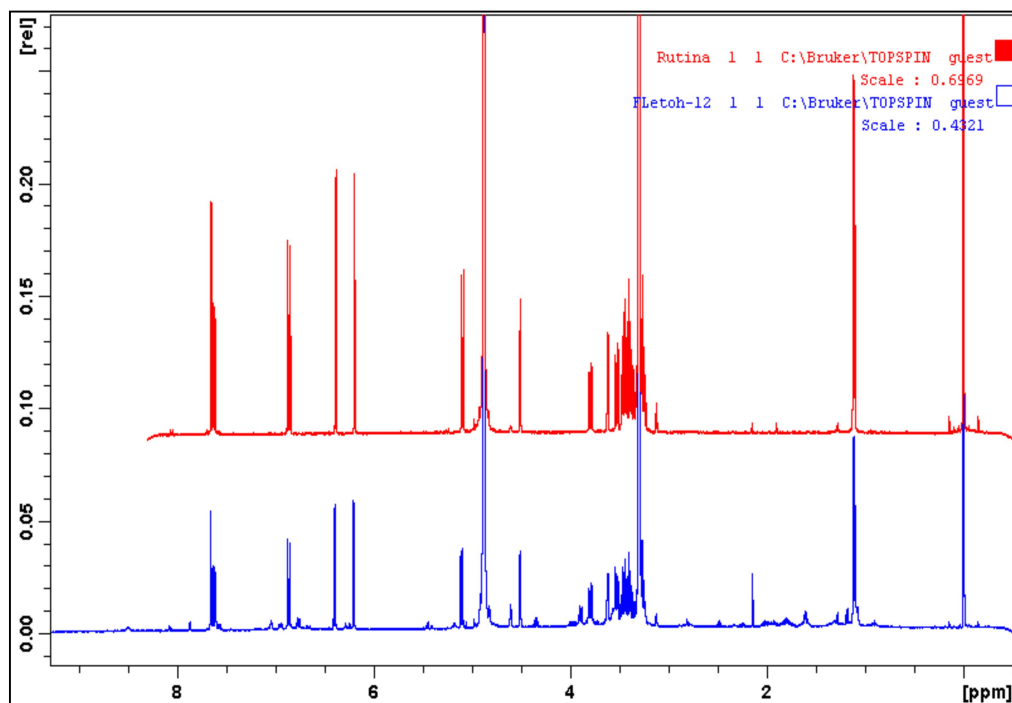


FIGURA 29 – ESPECTROS DE RMN DE  $^1\text{H}$  DE FLETOH-12 (AZUL) E PADRÃO DE RUTINA (VERMELHO)

Com o objetivo de identificar a molécula de FLETOH-12 de forma incontestável foram realizados os experimentos de HSQC e HMBC (FIGURAS 30 e 31). Entre as correlações mostradas no experimento de HSQC, citam-se:  $\delta_H$  7,68 (H-2') e  $\delta_C$  117,6 (C-2');  $\delta_H$  7,64 (H-6') e  $\delta_C$  121,6 (C-6');  $\delta_H$  6,88 (H-5') e  $\delta_C$  116,1 (C-5');  $\delta_H$  6,42 (H-8) e  $\delta_C$  94,5 (C-6);  $\delta_H$  6,22 (H-6) e  $\delta_C$  99,8 (C-6) e confirmando a presença dos resíduos de açúcares, glucose e ramnose,  $\delta_H$  5,10 (H-1'') e  $\delta_C$  104,2 (C-1'') e  $\delta_H$  4,51 (H-1''') e  $\delta_C$  102,4 (C-1'''), respectivamente.

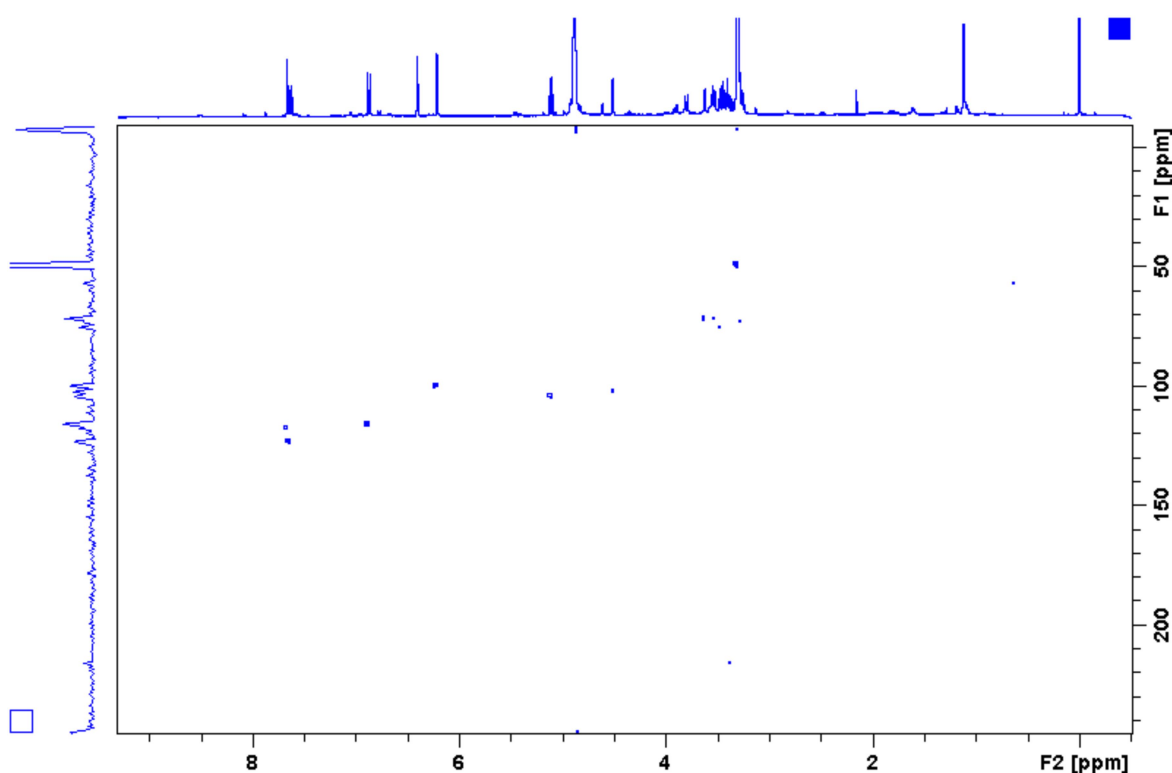


FIGURA 30 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO FLETOH-12.

O posicionamento dos resíduos de açúcares foi definido com base nas correlações mostradas no experimento HMBC (FIGURA 31). O sinal em  $\delta_H$  5,10 (H-1'') e  $\delta_C$  134,5 (C-3) e  $\delta_H$  4,51 (H-1''') e  $\delta_C$  68,4 (C-6''). Outras correlações observadas no mapa de contorno HMBC foram:  $\delta_H$  6,42 (H-8) e  $\delta_C$  105,4 (C-10) e 99,8 (C-6);  $\delta_H$  7,68 (H-2') e  $\delta_C$  149,5 (C-4').

Os dados espectrais obtidos foram comparados com os dados da literatura (NIASSY *et al.*, 2004) e confirmaram que o composto presente na fração FLETOH-12 se tratava da rutina ou 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1'' $\rightarrow$ 6'')- $\beta$ -glucopiranosídeo (TABELA 5).

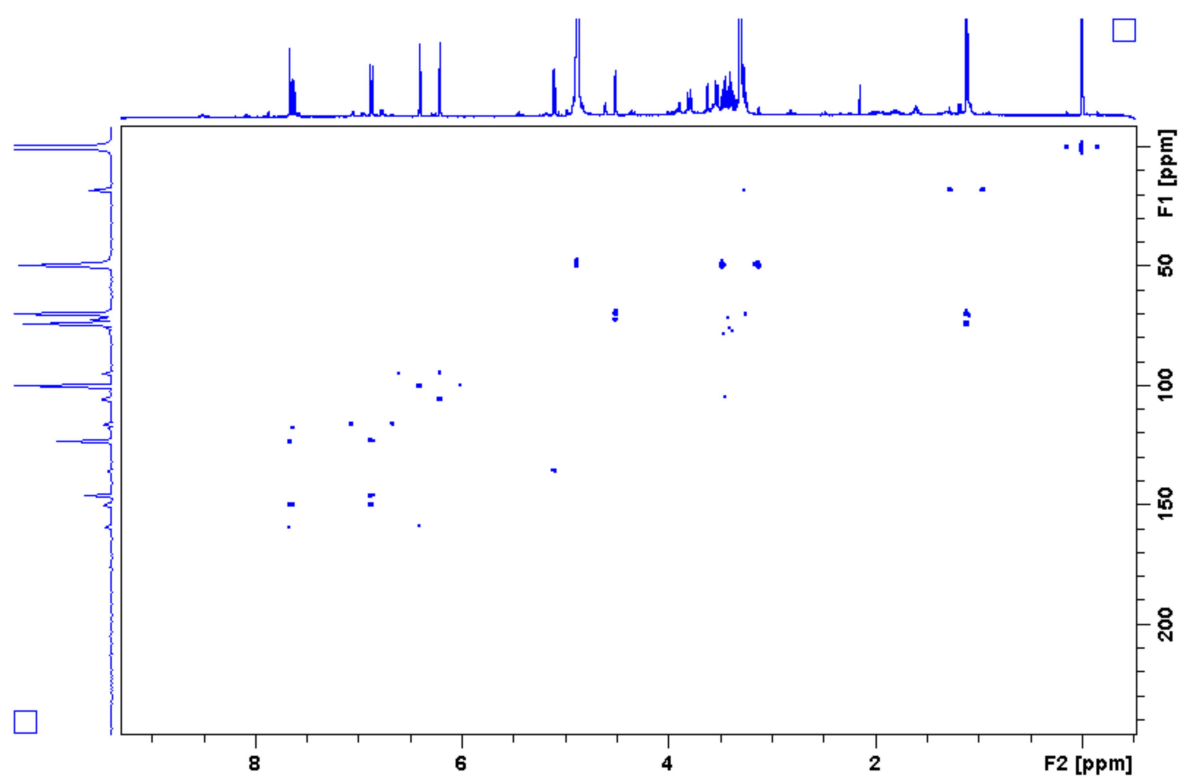


FIGURA 31 – MAPA DE CORRELAÇÃO  $^1\text{H}$  –  $^{13}\text{C}$  A LONGA DISTÂNCIA DA FRAÇÃO FLETOH-12

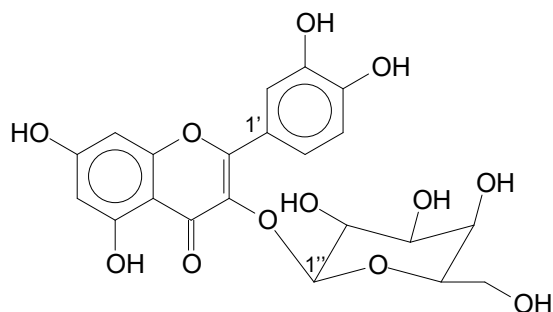
TABELA 5 - DADOS DE RMN DO COMPOSTO FLETOH-12 E RUTINA\*.

Posição	FLETOH-12 (MeOD)		RUTINA (DMSO-d <sub>6</sub> )*	
C	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$
2	-	157,3	-	156,7
3	-	134,5	-	133,4
4	-	166,0	-	177,4
5	-	158,3	-	161,3
6	6,22 (d, J= 2,1 Hz)	99,8	6,19 (d, J=1,9 Hz)	98,7
7	-	165,4	-	164,1
8	6,42 (d, J= 2,1 Hz)	94,5	6,38 (d, J=1,9 Hz)	93,7
9	-	162,6	-	156,5
10	-	105,4	-	104,0
1'	-	123,1	-	121,3
2'	7,68 (d, J= 2,0 Hz)	117,6	7,52 (d, J=2,2 Hz)	116,4
3'	-	145,9	-	144,8
4'	-	149,5	-	148,4
5'	6,88 (d, J= 8,3 Hz)	116,1	6,83 (d, J=9,0 Hz)	115,2
6'	7,64 (dd, J=8,3 e 2,0	121,6	7,53 (dd, J=9,0 e 2,2 Hz)	121,7
1''	5,10 (d, J=7,6 Hz)	104,2	5,34 (d, J=7,1 Hz)	102,0
2''	3,40 (s)	75,6	3,21 (s)	74,9
3''	3,44 (s)	78,3	3,30 (s)	77,4
4''	3,55 (d, J= 1,9 Hz)	71,7	3,31 (s)	70,5
5''	3,47 (s)	77,4	3,31 (s)	76,0
6''	3,68 / 3,37 (m)	69,8	3,70/3,28 (d, 9,8 Hz)	69,3
1'''	4,51 (d, J= 1,6 Hz)	102,4	4,38 (d, J= 1,1 Hz)	101,6
2'''	3,33 (d)	71,2	3,28 (s)	70,7
3'''	3,50 (d, J= 3,3 Hz)	70,9	3,28 (s)	70,5
4'''	3,30 (s)	72,8	3,08 (s)	71,9
5'''	3,55 (s)	69,1	3,25 (s)	68,4
6'''	1,12 (d, J= 6,2 Hz)	18,1	0,98 (d, J= 6,0 Hz)	17,3

FONTE:\*NIASSY *et al.* (2004).

Várias propriedades farmacológicas da rutina vêm sendo relatadas, como sua eficiência no tratamento da artrite causada por *Candida albicans* e atividade anti-candida (HAN, 2009), atividade antihiperlipidêmica (SANTOS *et al.*, 1999), efeito anticonvulsivante em ratos (NASSIRI-ASL *et al.*, 2008), supressão da imunidade celular (MIDDLETON *et al.*, 2000), atividade anticarcinogênica (MACHADO, 2005), efeito antiinflamatório (GUARDIA *et al.*, 2001).

### 5.3.4.3 Elucidação estrutural de Isoquercitrina



Da fração etanólica das flores de *P. venusta* foram isolados, por CLAE semi-preparativa, 5,0 mg de um composto codificado como FLETOH-13 que se apresentou como um sólido amarelo solúvel em metanol.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 32) apresentou cinco sinais com  $\delta_{\text{H}}$  entre 6,2 e 7,7 ppm, característicos de hidrogênios de aromáticos. Apresentou também um dubleto com  $\delta_{\text{H}}$  5,2 (H-1'') e constante de acoplamento de 7,3 Hz, característico de acoplamento axial-axial atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono anomérico do resíduo de açúcar glucose. Na região de  $\delta_{\text{H}}$  de 3,34 a 3,72 ppm encontram-se hidrogênios característicos de resíduos de açúcares.

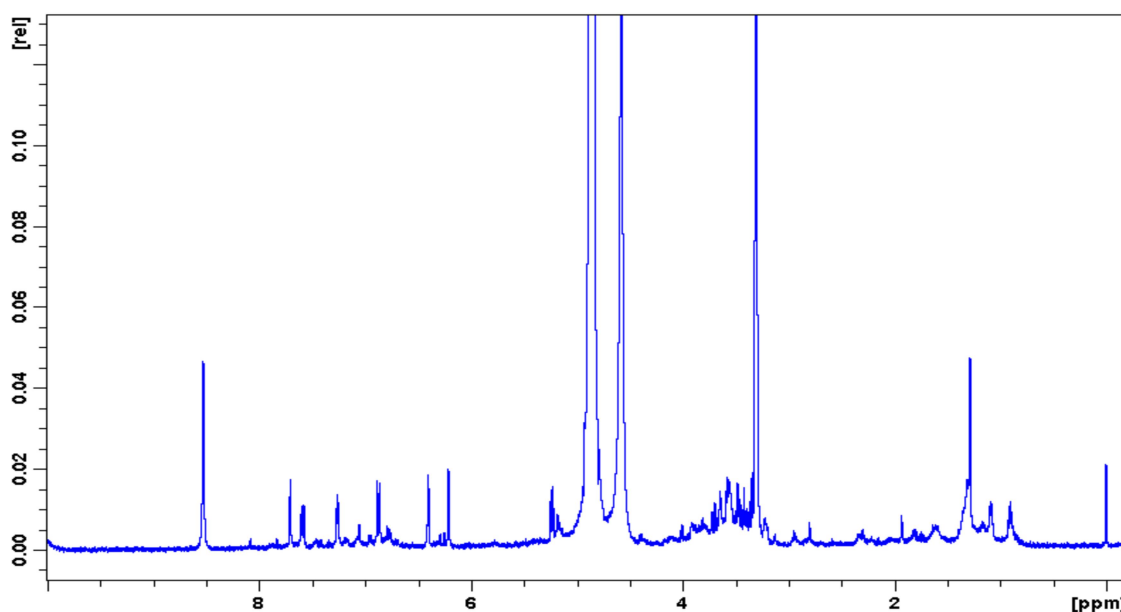


FIGURA 32 – ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DE FLETOH-13

O experimento de HSQC (FIGURA 33) revelou algumas importantes correlações que possibilitaram confirmar a presença do resíduo de açúcar  $\beta$ -glucose  $\delta_C$  104,5 (C-1'') e  $\delta_H$  5,24 (H-1'') e  $\delta_H$  3,58 e 3,72 (H-6'') correlacionados com o carbono em  $\delta_C$  62,5 (C-6''). Outras correlações observadas no mapa de contorno HSQC foram:  $\delta_H$  7,59 (H-6') e  $\delta_C$  123,5 (C-6');  $\delta_H$  7,71 (H-2') e  $\delta_C$  117,7 (C-2');  $\delta_H$  6,87 (H-5') e  $\delta_C$  116,3 (C-5');  $\delta_H$  6,21 (H-6) e  $\delta_C$  100,2 (C-6);  $\delta_H$  6,40 (H-8) e  $\delta_C$  95,0 (C-8).

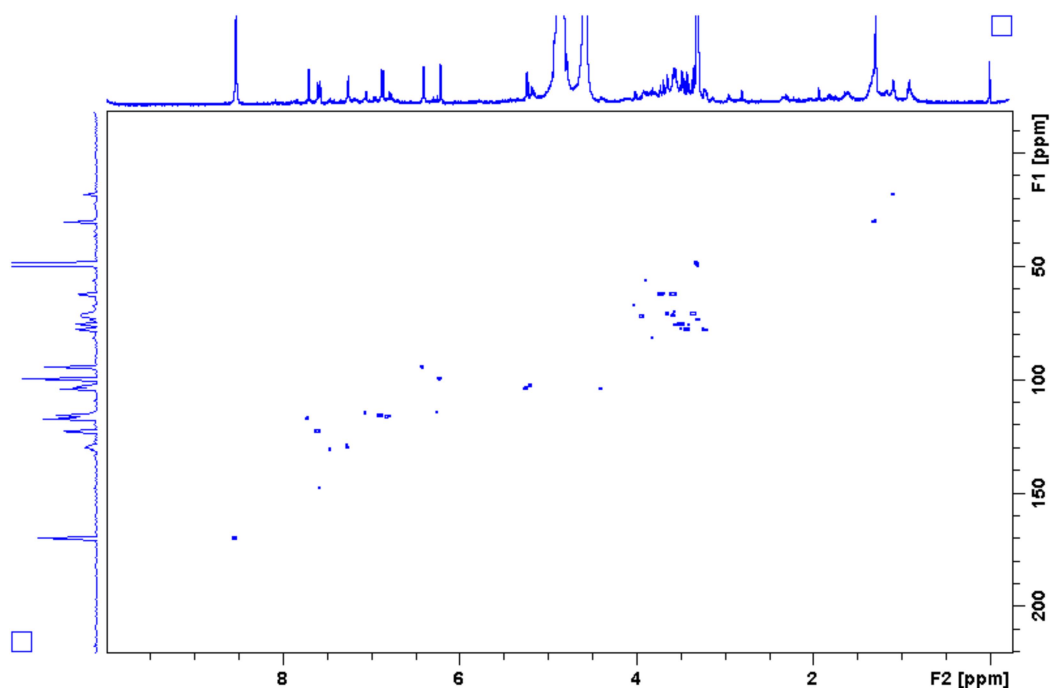


FIGURA 33 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  DE FLETOH-13

No experimento de HMBC, o posicionamento do resíduo de açúcar foi confirmado com base na correlação entre o hidrogênio anomérico  $\delta_H$  5,24 (H-1'') e o carbono do flavonol  $\delta_C$  135,8 (C-2) (FIGURA 34).

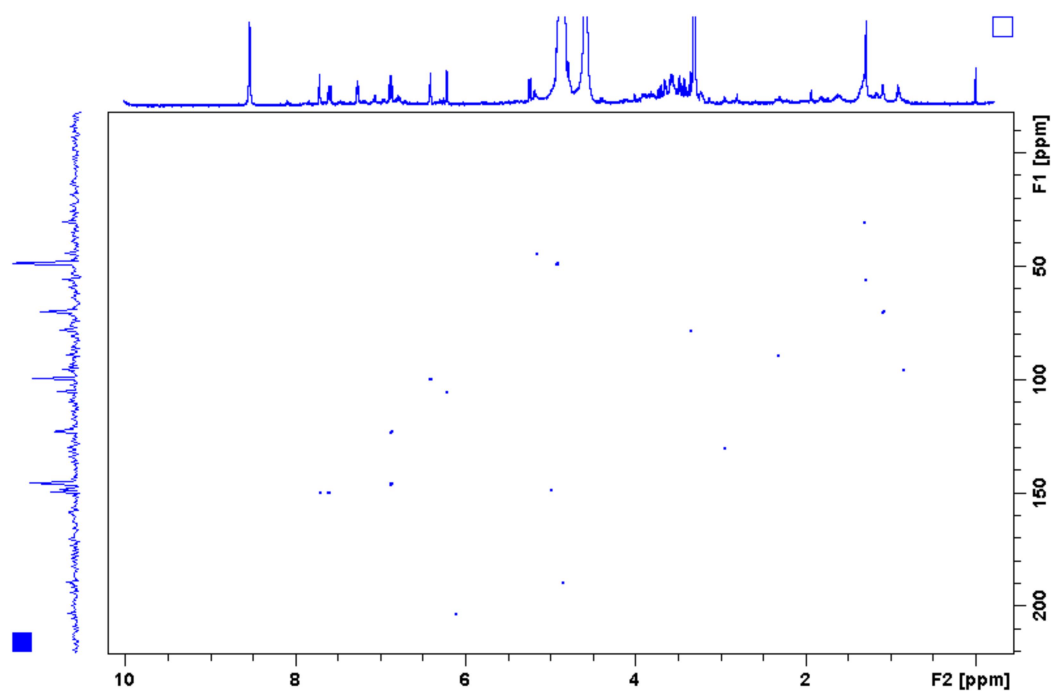


FIGURA 34 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTANCIA  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  DE FLETOH-13

A comparação dos dados espectrais obtidos foram comparados com os dados espectrais do composto isoquercitrina (COSTA *et al.*, 2007) e confirmaram que o composto presente na fração FLETOH-13 trata-se da quercetina-3-O- $\beta$ -D-glucopranoside ou isoquercitrina (TABELA 6).



TABELA 6 - DADOS DE RMN DO COMPOSTO FLETOH-13 E ISOQUERCITRINA\*.

Posição	FLETOH-13 (MeOD)		Isoquercitrina (CDCl <sub>3</sub> )*	
<b>C</b>	<b>δ<sub>H</sub></b>	<b>δ<sub>C</sub></b>	<b>δ<sub>H</sub></b>	<b>δ<sub>C</sub></b>
2	-	159,3	-	159,0
3	-	135,8	-	135,6
4	-	179,5	-	179,5
5	-	159,0	-	163,1
6	6,21 (d, J= 2,1 Hz)	100,2	6,21 (d, J=1,8 Hz)	99,9
7	-	166,0	-	166,0
8	6,40 (d, J= 2,1 Hz)	95,0	6,40 (d, J=1,8 Hz)	94,7
9	-	159,3	-	158,5
10	-	135,8	-	105,7
1'	-	123,2	-	123,1
2'	7,71 (d, J= 2,2 Hz)	117,7	7,71 (d, J=1,8 Hz)	117,6
3'	-	146,2	-	145,9
4'	-	150,0	-	149,8
5'	6,87 (d, J= 8,5 Hz)	116,3	6,86 (d, J=8,5 Hz)	116,0
6'	7,59 (dd, J=8,5 e 2,2 Hz)	123,5	7,58 (dd, J=8,5 e 1,8 Hz)	123,2
1''	5,24 (d, J=7,5 Hz)	104,5	5,24 (d, J=7,9 Hz)	104,3
2''	3,49 (s)	75,7		75,7
3''	3,23 (s)	78,4		78,4
4''	3,50 (m)	73,2	3,29-3,80	71,7
5''	3,44 (s)	78,1		78,1
6''	3,58 / 3,72 (m)	62,5		64,4

FONTE: \* COSTA *et al.* (2007).

A espectrometria de massas também foi empregada na caracterização de FLETOH-13. O espectro de ESI(+)-EM do composto FLETOH-13 (FIGURA 36), mostrou a formação do íon de  $m/z$  487,2  $[M+Na]^+$  com abundância relativa em torno de 30% e também o íon fragmento de  $m/z$  301,2 com abundância em torno de 95% (FIGURA 35). Este fragmento é consistente com a quercetina sem a unidade de açúcar, o qual já fora previamente relatado para flavonóides de *M. ilicifolia* (DE SOUZA *et al.*, 2008).

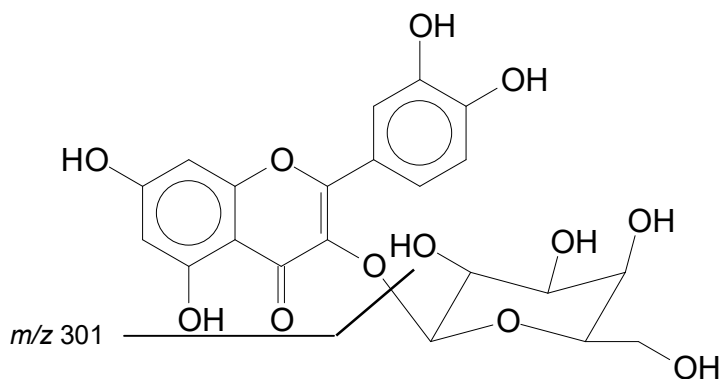


FIGURA 35 – REPRESENTAÇÃO DA QUEBRA DA LIGAÇÃO GLICOSÍDICA E POSTERIOR FORMAÇÃO DO FRAGMENTO  $m/z$  301.

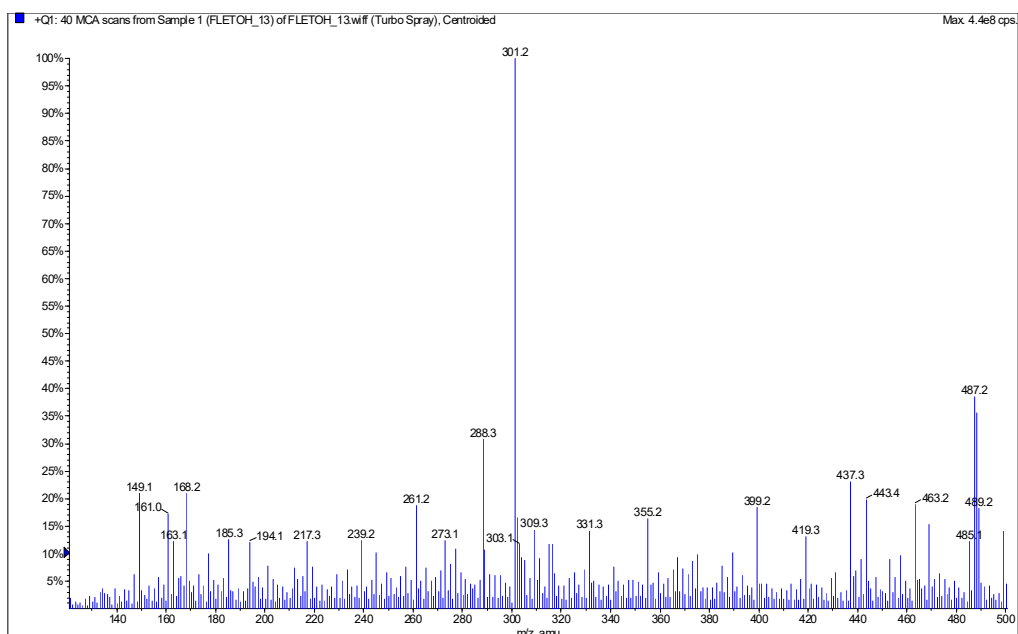


FIGURA 36 – ESPECTRO DE ESI(+)-EM DO COMPOSTO FLETOH-13.

O experimento de ESI(+)-EM/EM do íon de  $m/z$  487,2  $[M+Na]^+$  revelou dois íons fragmentos ou íons produtos:  $m/z$  324, que corresponde a perda do resíduo de açúcar glicose, ou seja, é o aduto de sódio da aglicona de FLETOH-13 (FIGURA 37). No que diz respeito ao íon produto de  $m/z$  185, ele é formado também da quebra da ligação glicosídica, mas, neste caso, forma-se o aduto de sódio desprotonado do glicosídeo.

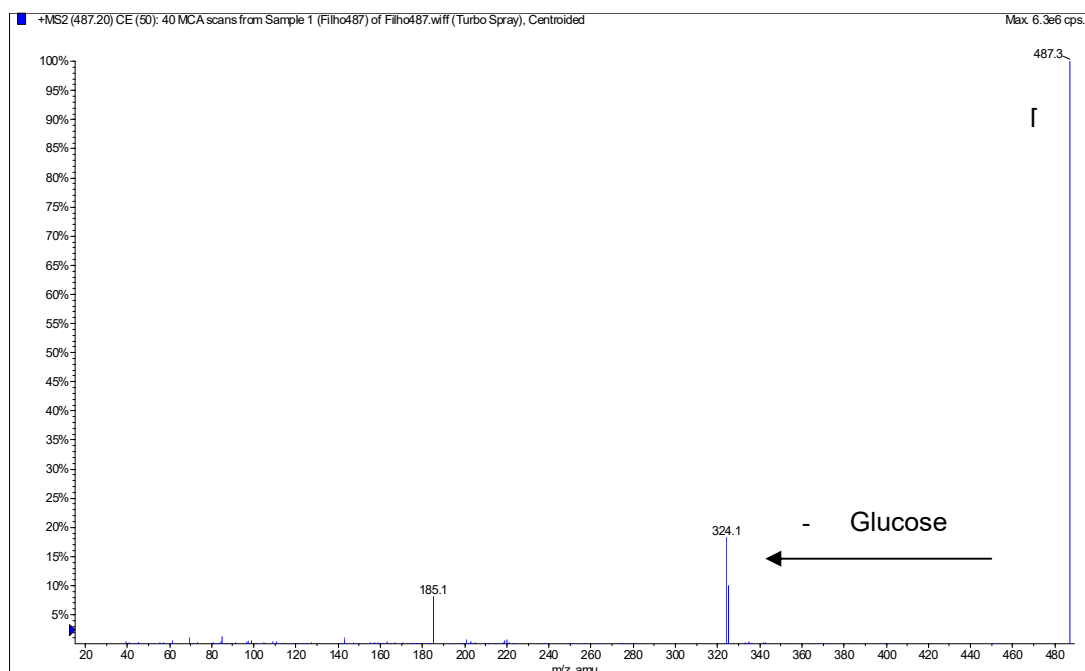
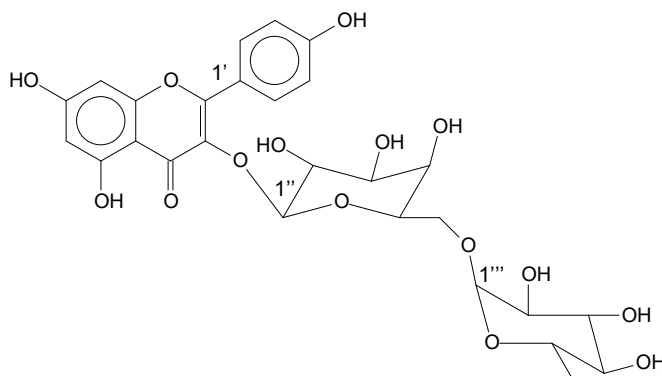


FIGURA 37 – ESPECTRO DE ESI(+)-EM/EM DO ION DE  $m/z$  487,2  $[M+NA]^+$ .

Os dados espectrais obtidos, por espectrometria de massas, foram comparados com os dados da literatura (DE SOUZA *et al.*, 2008) e confirmam a identidade da isoquercitrina.

No trabalho publicado por SOBERON *et al.* (2010) a isoquercitrina demonstrou algumas propriedades farmacológicas interessantes tais como atividade anti-inflamatória, atividade anti-oxidante e não apresentou efeito genotóxico no ensaio com o *Bacillus subtilis*.

#### 5.3.4.4 Elucidação estrutural de Nicotiflorina



Da fração etanólica das flores de *P. venusta* foram isolados, por CLAE semi-preparativa, 6,0 mg de um composto codificado como FLETOH-14 que se apresentou como um sólido amarelo solúvel em metanol.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 38) apresenta seis sinais com  $\delta_{\text{H}}$  entre 6,21 e 8,1 ppm, característicos de hidrogênios de flavonóides. Apresenta também dois dubletos, com  $\delta_{\text{H}}$  5,12 (H-1'') de constante de acoplamento de 7,2 Hz, característico de acoplamento axial-axial atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono anomérico do resíduo de açúcar glucose. O sinal  $\delta_{\text{H}}$  4,51 (H-1''') com constante de acoplamento de 1,09 Hz é característico de configuração  $\alpha$  do resíduo de açúcar. Os hidrogênios metílicos, em  $\delta_{\text{H}}$  1,12 (H-6''') de constante de acoplamento de 6,3 Hz, ajudaram a caracterizar este resíduo de açúcar como ramnosídeo. Na região de  $\delta_{\text{H}}$  de 3,27 a 3,80 ppm encontram-se os demais hidrogênios característicos dos resíduos de açúcares.

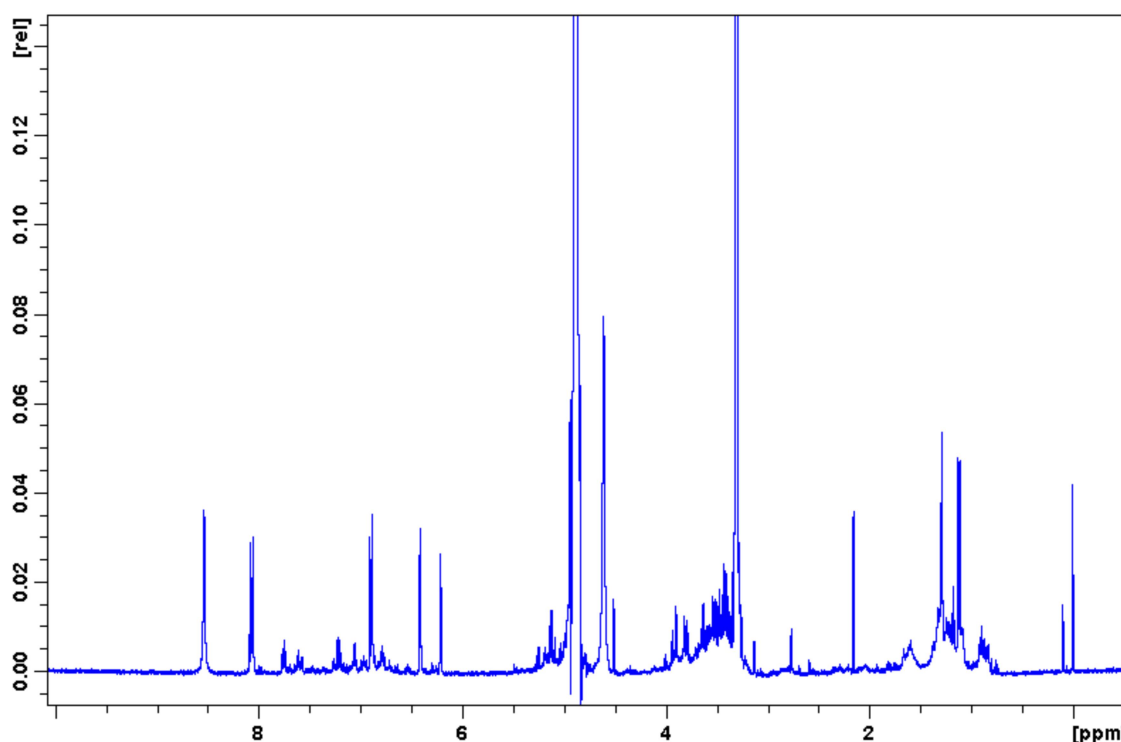


FIGURA 38 – ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA FRAÇÃO FLETOH-14.

O experimento de HSQC (FIGURA 39) revelou algumas importantes correlações que possibilitaram confirmar a presença dos resíduos de açúcares do flavonóide presente na fração FLETOH-14. São elas:  $\delta_{\text{C}}$  104,8 (C-1'') e  $\delta_{\text{H}}$  5,12

(H-1'') e  $\delta_H$  3,38 e 3,78 (H-6'') correlacionados com o carbono em  $\delta_C$  68,9 (C-6''),  $\delta_C$  102,6 (C-1'') e  $\delta_H$  4,51 (H-1'') e ainda  $\delta_C$  18,1 (C-6'') e  $\delta_H$  1,12 (H-6''). Estas correlações confirmaram a presença dos resíduos de açúcares  $\beta$ -glucose e  $\alpha$ -amnose.

Outras correlações observadas no mapa de correlação HSQC foram:  $\delta_H$  8,07 (H-2' e H-6') e  $\delta_C$  132,6 (C-2' e C6');  $\delta_H$  6,89 (H-3' e H5') e  $\delta_C$  116,3 (C-3' e C-5');  $\delta_H$  6,21 (H-6) e  $\delta_C$  100,2 (C-6);  $\delta_H$  6,41 (H-8) e  $\delta_C$  95,1 (C-8) as quais suportaram a identificação dos resíduos de açúcares (FIGURA 40).

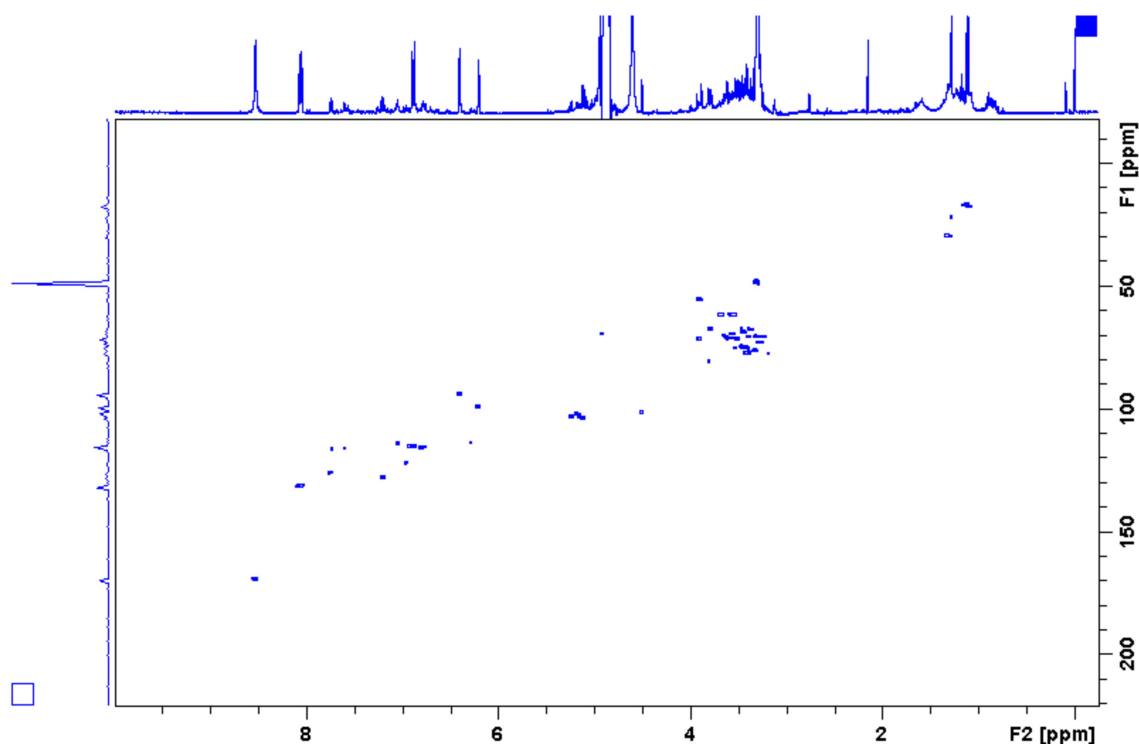


FIGURA 39 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO FLETOH-14.

O posicionamento dos resíduos de açúcares foi definido com base nas correlações mostradas no mapa de correlação  $^1\text{H}$  –  $^{13}\text{C}$  a longa distância (FIGURA 39). O sinal em  $\delta_H$  5,12 (H-1'') e  $\delta_C$  135,3 (C-3) e  $\delta_H$  4,51 (H-1'') e  $\delta_C$  68,9 (C-6''). Outras correlações observadas no mapa de correlação HMBC foram:  $\delta_H$  6,89 (H-5') e  $\delta_C$  123,0 (C-1'), 116,3 (C-3') e 161,8 (C-4');  $\delta_H$  8,07 (H-2') e  $\delta_C$  161,8 (C-4'), 159,6 (C-2) e 132,6 (C-6');  $\delta_H$  6,21 (H-6) e  $\delta_C$  166,5 (C-7), 158,7 (C-

5), 105,8 (C-10) e 95,1 (C-8);  $\delta_H$  6,21 e  $\delta_C$  100,2 (C-6) e 105,8 (C-10) suportam a identificação estrutural.

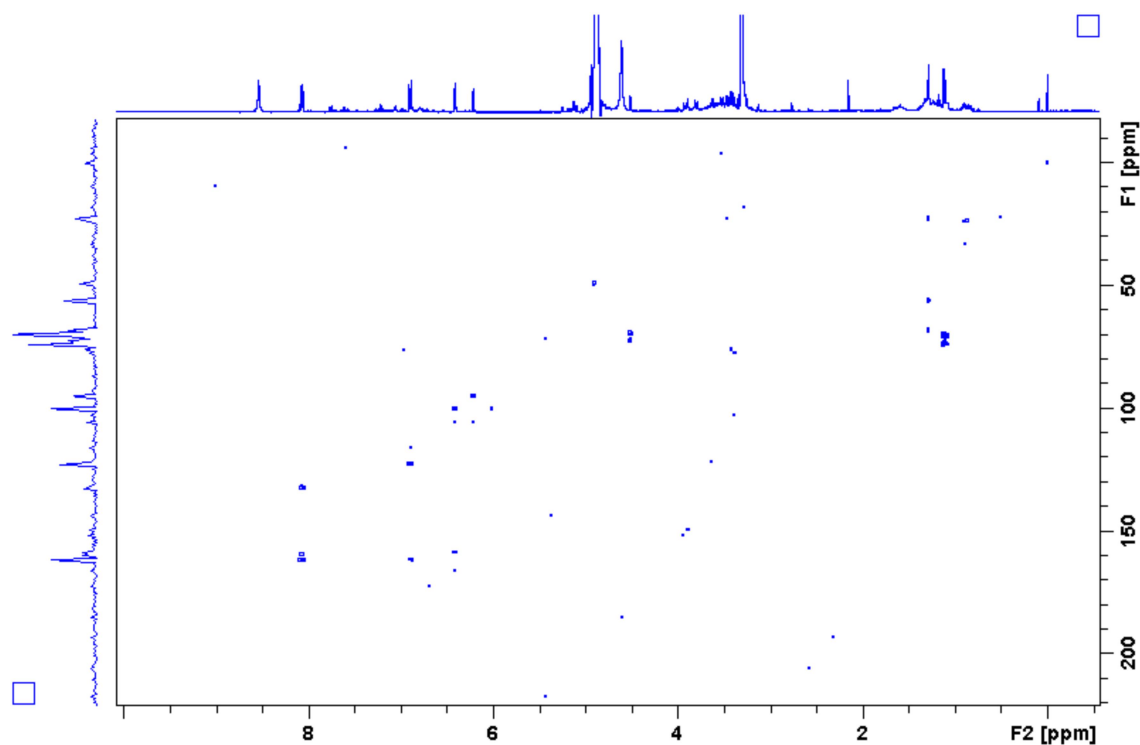


FIGURA 40 – MAPA DE CORRELAÇÃO  $^1H$ - $^{13}C$  A LONGA DISTANCIA DA FRAÇÃO FLETOH-14.

Os dados espectrais obtidos foram comparados com o do composto nicotiflorina (YANG *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2010) e confirmaram que o composto presente na fração FLETOH-14 se trata do caempferol-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopiranosil (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranoside (TABELA 7).

TABELA 7 - DADOS DE RMN DO COMPOSTO FLETOH-14 E NICOTIFLORINA\*.

Posição	FLETOH-12 (MeOD)		Nicotiflorina (DMSO-d <sub>6</sub> )*	
<b>C</b>	<b>δ<sub>H</sub></b>	<b>δ<sub>C</sub></b>	<b>δ<sub>H</sub></b>	<b>δ<sub>C</sub></b>
2	-	159,6	-	158,3
3	-	135,3	-	135,3
4	-	179,5	-	178,8
5	-	158,7	-	162,6
6	6,22 (d, J= 2,1 Hz)	100,2	6,33 (br. s)	100,4
7	-	166,5	-	166,8
8	6,42 (d, J= 2,1 Hz)	95,1	6,16 (br. s)	95,1
9	-	158,4	-	159,0
10	-	105,8	-	105,2
1'	-	123,0	-	122,5
2'	7,68 (d, J= 2,0 Hz)	132,6	8,03 (d, J=8,8 Hz)	132,2
3'	-	116,3	6,87 (d, J=8,8 Hz)	116,0
4'	-	161,8	-	161,2
5'	6,88 (d, J= 8,3 Hz)	116,3	6,87 (d, J=8,8 Hz)	116,0
6'	7,64 (dd, J=8,3 e 2,0 Hz)	132,6	8,03 (d, J=8,8 Hz)	132,2
1''	5,10 (d, J=7,6 Hz)	104,8	5,16 (d, J=7,6 Hz)	104,7
2''	3,40 (s)	76,1	-	75,6
3''	3,44 (s)	78,3	-	77,9
4''	3,55 (d, J= 1,9 Hz)	72,6	-	71,3
5''	3,47 (s)	70,7	-	69,6
6''	3,68 / 3,37 (m)	68,9	-	68,5
1'''	4,51 (d, J= 1,6 Hz)	102,6	4,52 (br. s)	102,2
2'''	3,33 (d)	71,9	-	71,9
3'''	3,50 (d, J= 3,3 Hz)	71,6	-	72,2
4'''	3,30 (s)	74,2	-	73,8
5'''	3,55 (s)	70,1	-	69,6
6'''	1,12 (d, J= 6,2 Hz)	18,1	1,13 (d, J= 6,4 Hz)	17,9

FONTE: \*YANG *et al.* (2005).

A espectrometria de massas também foi empregada na caracterização do composto presente na fração FLETOH-14. O espectro de ESI(+)-EM de FLETOH-14 (FIGURA 41), apresentou o aduto de sódio de  $m/z$  617,2 com abundância relativa em torno de 50%.

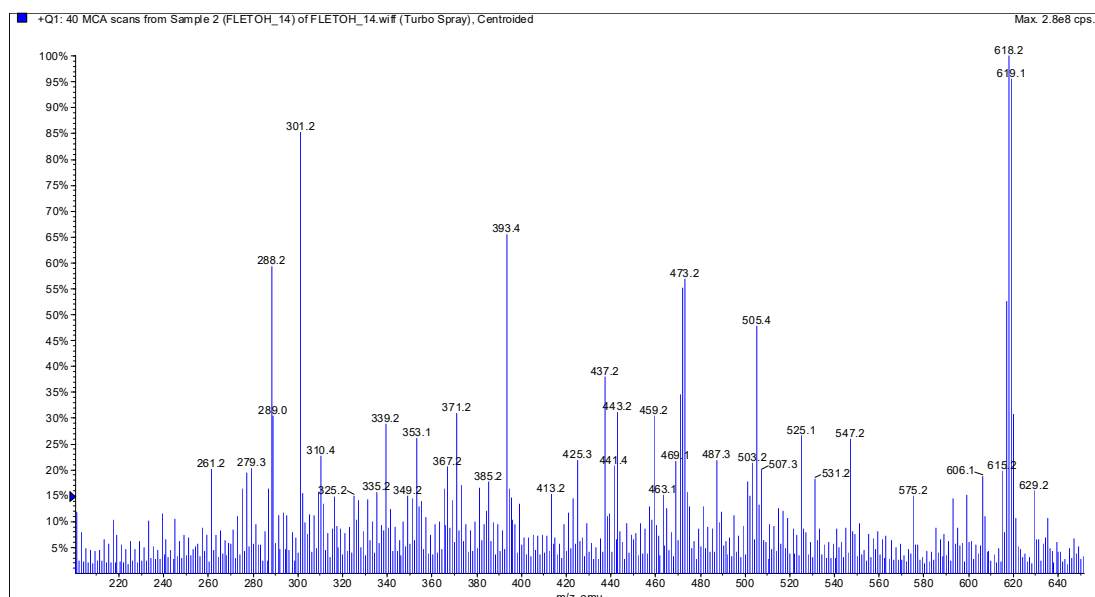


FIGURA 41 – ESPECTRO DE ESI(+)-EM DO COMPOSTO FLETOH-14.

A fragmentação do íon de  $m/z$  617,2  $[M+Na]^+$ , no experimento de ESI(+)-EM/EM, resultou em dois íons fragmentos principais de  $m/z$  331 e de  $m/z$  308 (FIGURA 42). Sendo que o íon produto de  $m/z$  331 é proveniente da quebra da ligação glicosídica e, como resultado, forma-se a porção dissacarídeo associada com sódio e desprotonada do carboidrato.

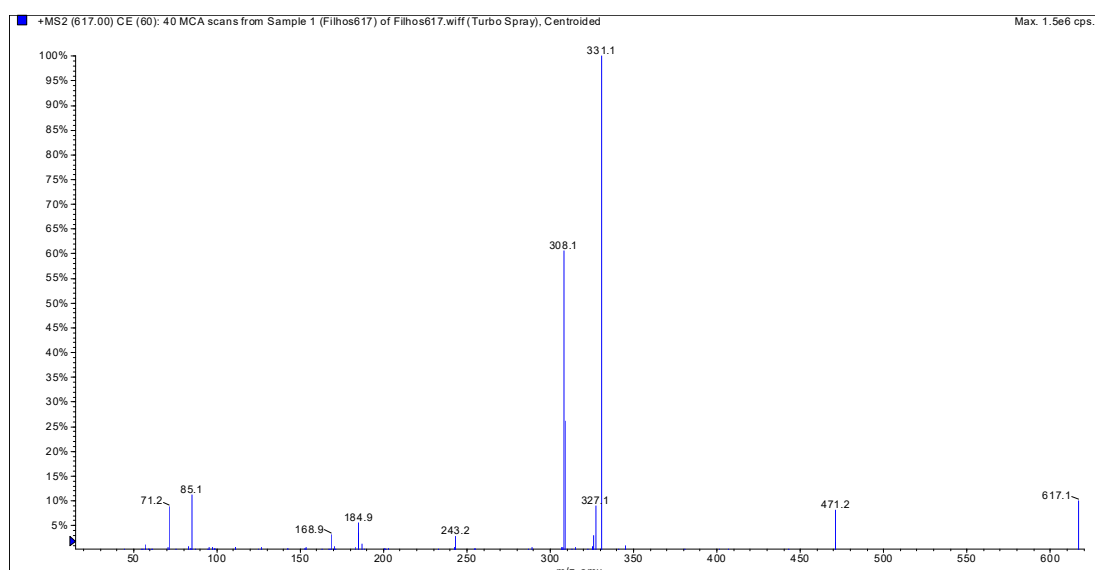


FIGURA 42 – ESPECTRO DE ESI(+)-EM/EM DO ION DE  $m/z$  617,1  $[M+Na]^+$ .



Um íon comumente encontrado na caracterização de caempferol por espectrometria de massas é o fragmento de  $m/z$  285 que corresponde a aglicona do caempferol desprotonada (DE SOUZA *et al.*, 2008). Na verdade, a aglicona associada com sódio caempferol é o íon produto de  $m/z$  308 que, em última análise, é mais estável que os íons protonados e, nas condições analíticas empregadas, os adutos de sódio são favorecidos.

Os dados espectrais obtidos, por espectrometria de massas, confirmam que o composto presente na fração FLETOH-14 se trata da nicotiflorina.

#### 5.3.5 Caracterização do composto majoritário Rutina da fração metanólica das folhas de *P. venusta*.

Da fração metanólica das folhas de *P. venusta* foi isolado, por CLAE, 15,3 mg de um composto codificado como FOMEOH-9 que se apresentou como um sólido amarelo solúvel em metanol. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de FOMEOH-9 foi totalmente sobreponível, com aquele do padrão de rutina, confirmando que o isolamento via CLAE semi-preparativa resultou em um composto de considerável pureza (FIGURA 43).

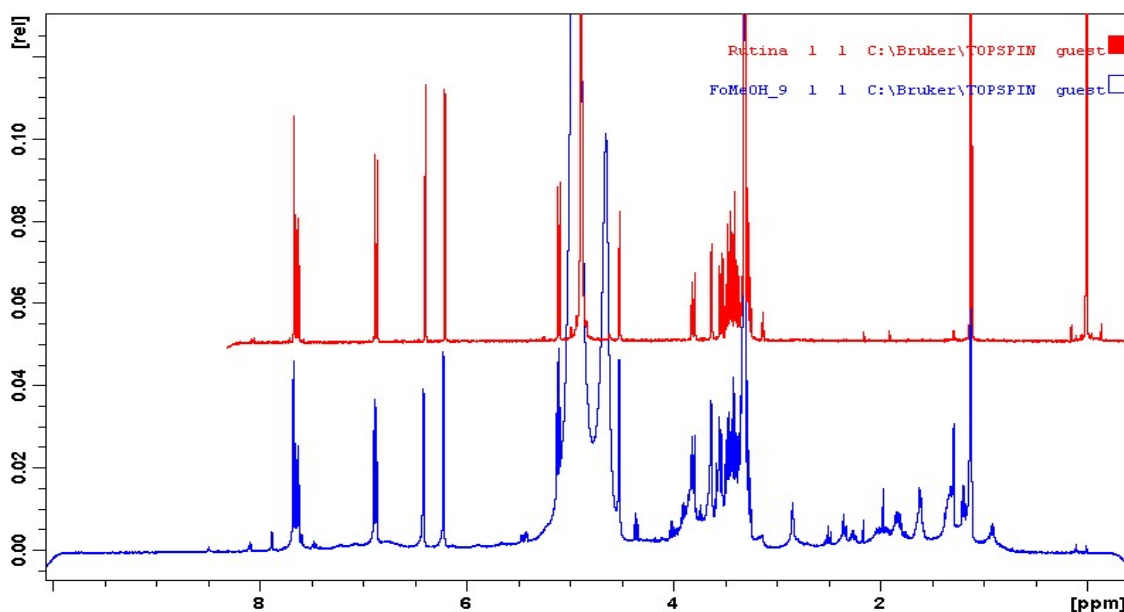


FIGURA 43 – ESPECTROS DE RMN DE  $^1\text{H}$  DE FOMEOH-9 (AZUL) E PADRÃO DE RUTINA (VERMELHO)

Com base na análise comparativa do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto da fração FOME OH-9 com o espectro do padrão de rutina, conclui-se que o referido composto é a rutina, pois nota-se a total sobreposição dos espectros de hidrogênio da fração FOME OH-9 e da rutina. A rutina já fora relatada nas folhas de *P. venusta* no trabalho de BLATT *et al.* (1998). Os dados espectroscópicos obtidos para FOME OH-9 estão de acordo com aqueles encontrados no trabalho de NIASSY *et al.* (2004).

#### 5.4 CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO COMPOSTO P-1

A caracterização do composto P-1 foi possível por meio da análise de RMN de  $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC diretamente no extrato etanólico das flores e raízes de *P. venusta* e não foi realizado o isolamento deste composto.

A análise do mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (FIGURA 44), evidenciou uma única correlação entre o hidrogênio de H-5 ( $\delta_{\text{H}}$  5,42) com o carbono metílico C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  64,2).

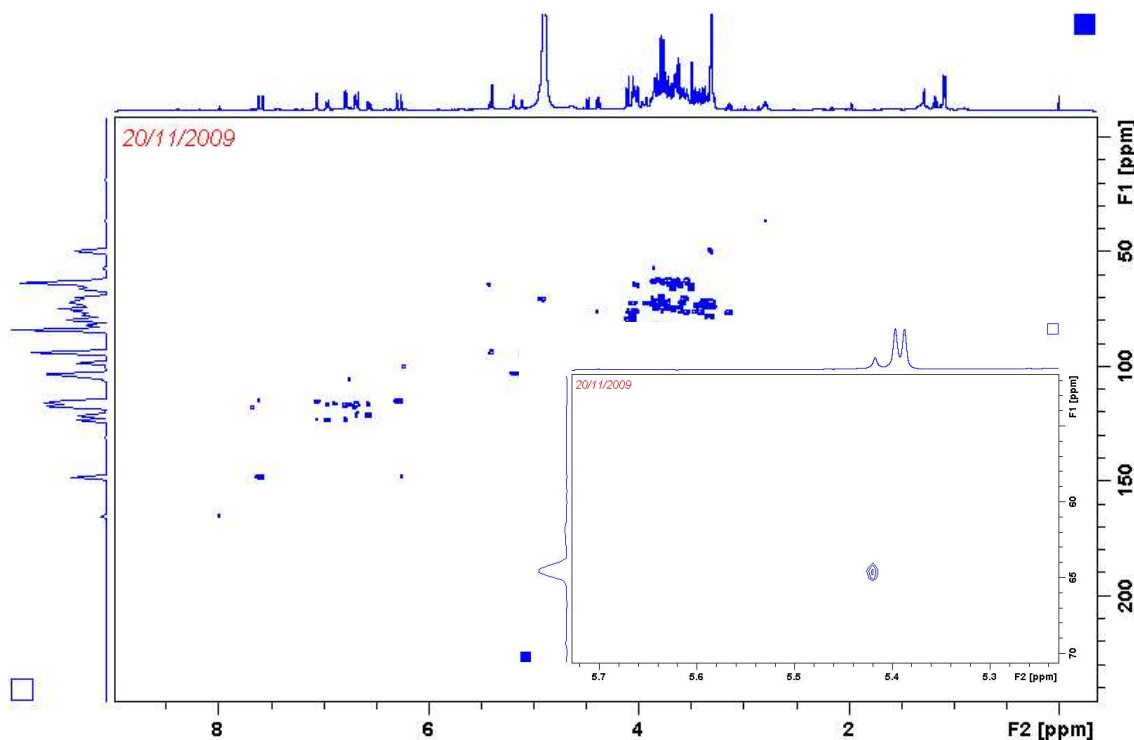


FIGURA 44 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA  $^1\text{H}$  –  $^{13}\text{C}$  DE FLETOH.

Já o mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distancia (HMBC, FIGURA 45) revelou três correlações do hidrogênio em 5,42 ppm e com os átomos de carbonos de grupos carbonílicos: C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  159,1), C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  160,4) e C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  175,1).

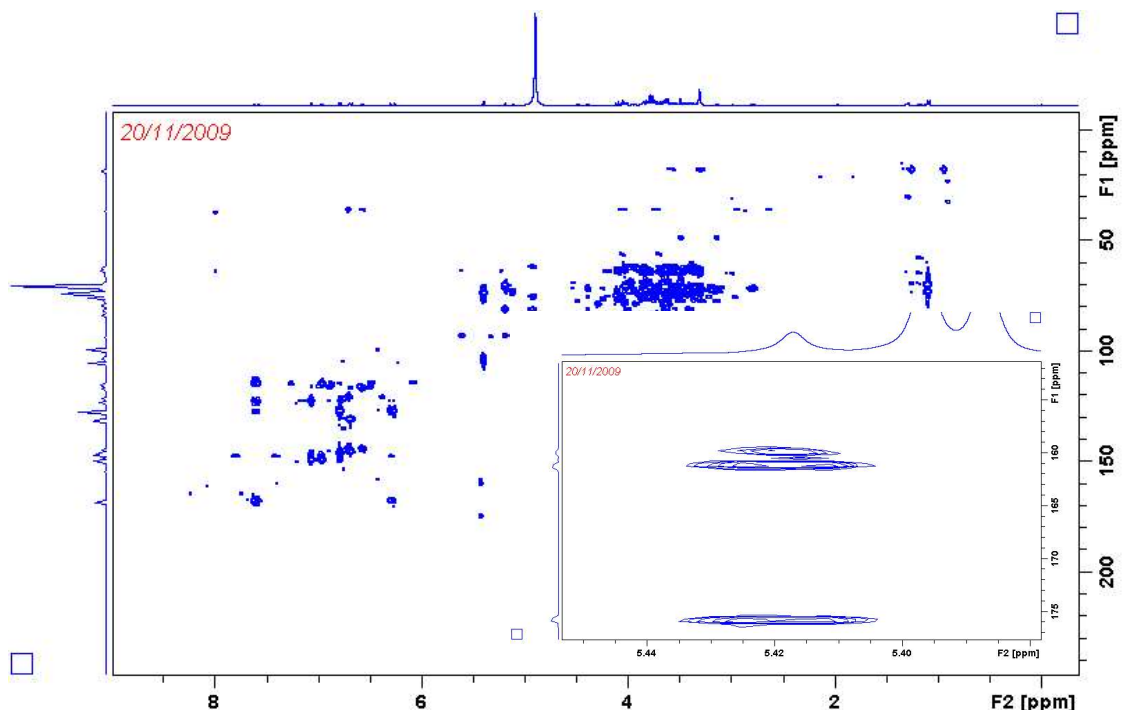
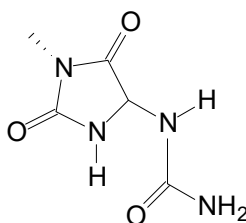


FIGURA 45 – MAPA DE CORRELAÇÃO  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  A LONGA DISTÂNCIA DE FLETOH.

Com base nestes dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparados com valores descritos na literatura (FERREIRA *et al.*, 2000) foi possível identificar a presença de alantoína na fração P-1 proveniente das flores de *P. venusta*. (TABELA 8). Não há relatos na literatura da caracterização de alantoína nas flores desta espécie, apenas nas raízes.



Alantoína

TABELA 8 – DADOS DE RMN DE  $^1\text{H}$  E  $^{13}\text{C}$  PARA P-1 E ALANTOÍNA NA FRAÇÃO FLETOH.

Posição	<i>P-1 (MeOD)</i>		<i>Alantoína (DMSO-d6)</i>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	-	-	10,54	-
2	-	159,1	5,82	157,7
3	-	-	8,05	-
4	-	175,1	-	173,4
5	5,42	64,2	5,21	62,65
6	-	-	-	-
7	-	160,4	-	156,7
8	-	-	-	-

FONTE: FERREIRA *et al.* (2000).

A alantoína possui atividade antiinflamatória, antipsoríase, imunoestimulante, além de ser muito utilizada em dermatologia (FERREIRA *et al.*, 2000), portanto, é uma candidata em potencial como um princípio ativo no ensaio de proliferação espontânea de melanina.

Em vista disso, foi adaptado um método analítico por CLAE (BERTHEMY *et al.*, 1999), em fase reversa, para separação e identificação preliminar deste composto correspondente na amostra via comparação de tempo de retenção com o padrão de alantoína e análise via biblioteca espectral, além disso, as amostras foram fortificadas com o padrão de alantoína.

A limpeza das amostras de extratos brutos de flores, folhas e razes de *P. venusta* utilizando extração em fase sólida – SPE (C18 *endcapped*) foi uma etapa determinante na purificação para as análises por CLAE. Isso deve ao fato de que em todas as partes de *P. venusta* investigadas foram observadas evidências de que havia co-eluição de um ou mais compostos com o pico correspondente a alantoína. Os cromatogramas do extrato bruto de flores foram adquiridos a 220 nm e 310 nm (FIGURA 46 A e 46 B, respectivamente), o cromatograma a 220 nm revelou um pico com  $t_r = 6,28$  minutos, correspondente a alantoína. Além disso, foi observado no cromatograma a 310 nm um pico com  $t_r = 6,31$  minutos. Entretanto, a alantoína não absorve nesta região do espectro de ultravioleta (230 a 400 nm), o que foi evidenciado na análise espectral do pico da Alantoína (vermelho) comparativamente ao pico em  $t_r = 6,28$  minutos (azul) (FIGURA 46 C).

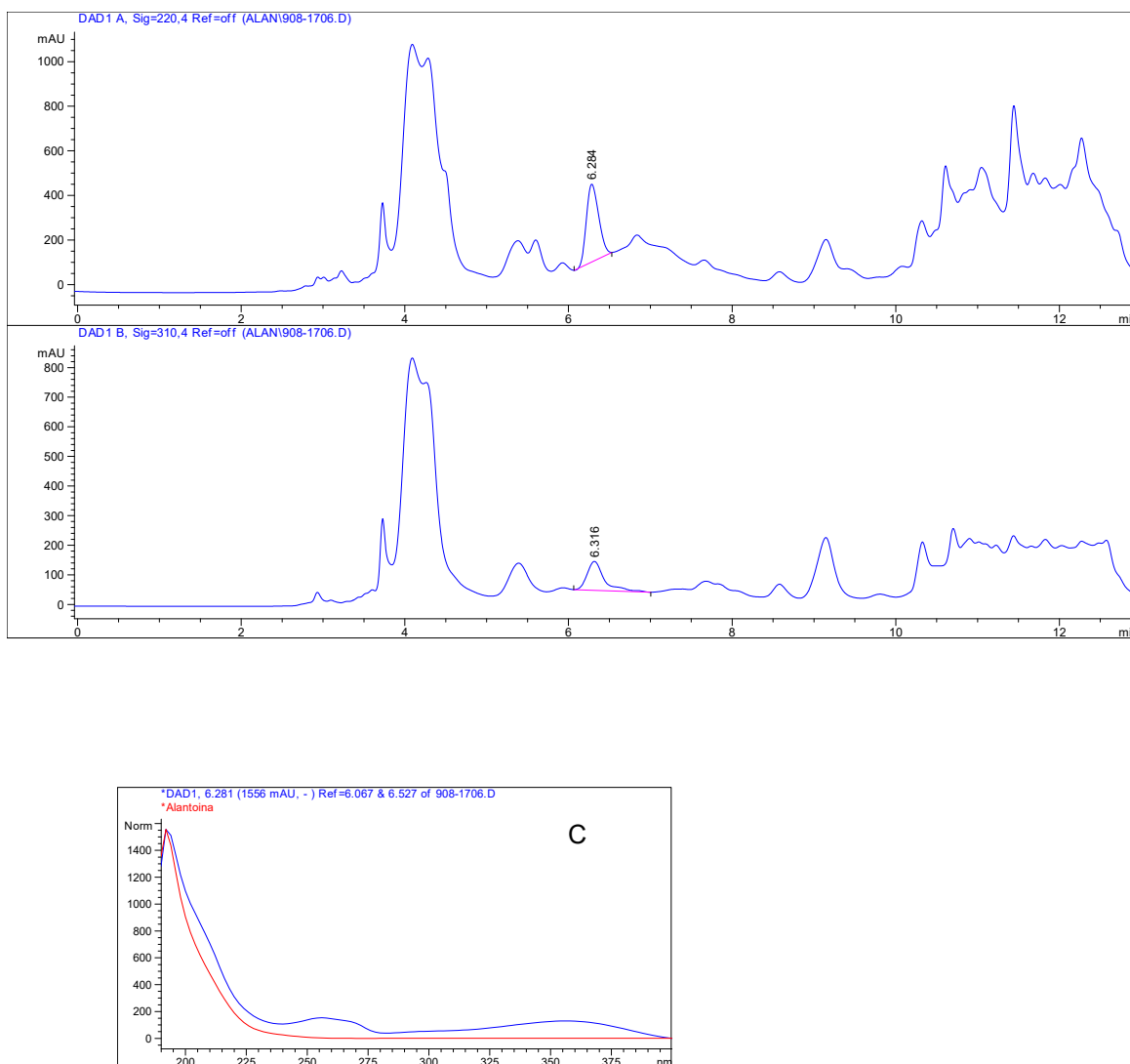


FIGURA 46 – CROMATOGRAMAS DO EXTRATO BRUTO DAS FLORES DE *P. venusta* SEM CLEAN UP

NOTA: A) A - EM 220 NM; B - 310 NM E COMPARAÇÃO DE PERFIS ESPECTRAIS DO PICO DE TR = 6,28 MIN (AZUL) COM O ESPECTRO DO PADRÃO DE ALANTOÍNA (VERMELHO) (C).

A eficácia da limpeza da amostra do extrato bruto das flores de *P. venusta*, pôde ser constatada tanto pela diferença no perfil cromatográfico da amostra quanto pelo perfil espectral do pico correspondente a alantoína na amostra (tr = 6,220 minutos) (FIGURAS 47 A e B). O mecanismo de purificação das amostras pode ser explicado pela interação química dos compostos coloridos e demais

interferentes da amostra com C18 e pela ausência de interação da alantoína com a fase estacionária. Nos testes realizados, a alantoína foi resuperada quantitativamente pelo eluato polar empregado.

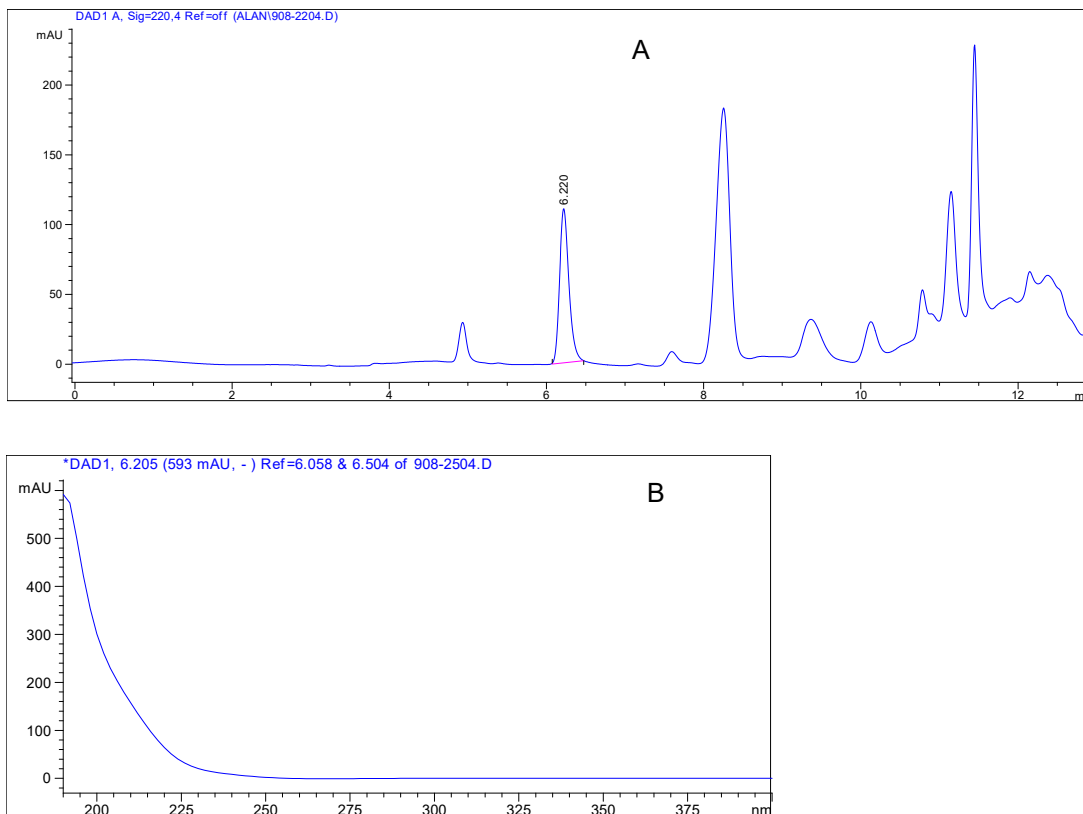


FIGURA 47 – CROMATOGRAMA DE EXTRATO BRUTO DAS FLORES APÓS PURIFICAÇÃO COM SPE COM COMPRIMENTO DE ONDE DE 220 nm (A) E ESPECTRO DE UV DO PICO EM 6,220 MINUTOS (B).

Situação análoga foi observada para os extratos de folhas e raízes de *P. venusta*. Isto é, na ausência de purificação, por meio de SPE, observou-se que outros compostos eluíam concomitantemente com o pico correspondente a alantoína nessas amostras. Após a purificação das amostras de folhas e raízes, não foram observadas evidências que indicassem co-eluição de outros compostos com o pico correspondente a alantoína e, além disso, o perfil cromatográfico de raízes e folhas, nestas condições, foi claramente melhor no sentido de apresentar uma carga muito menor de interferentes (FIGURA 48 A e B), o que, em última análise, contribui para aumentar a vida útil da coluna cromatográfica.

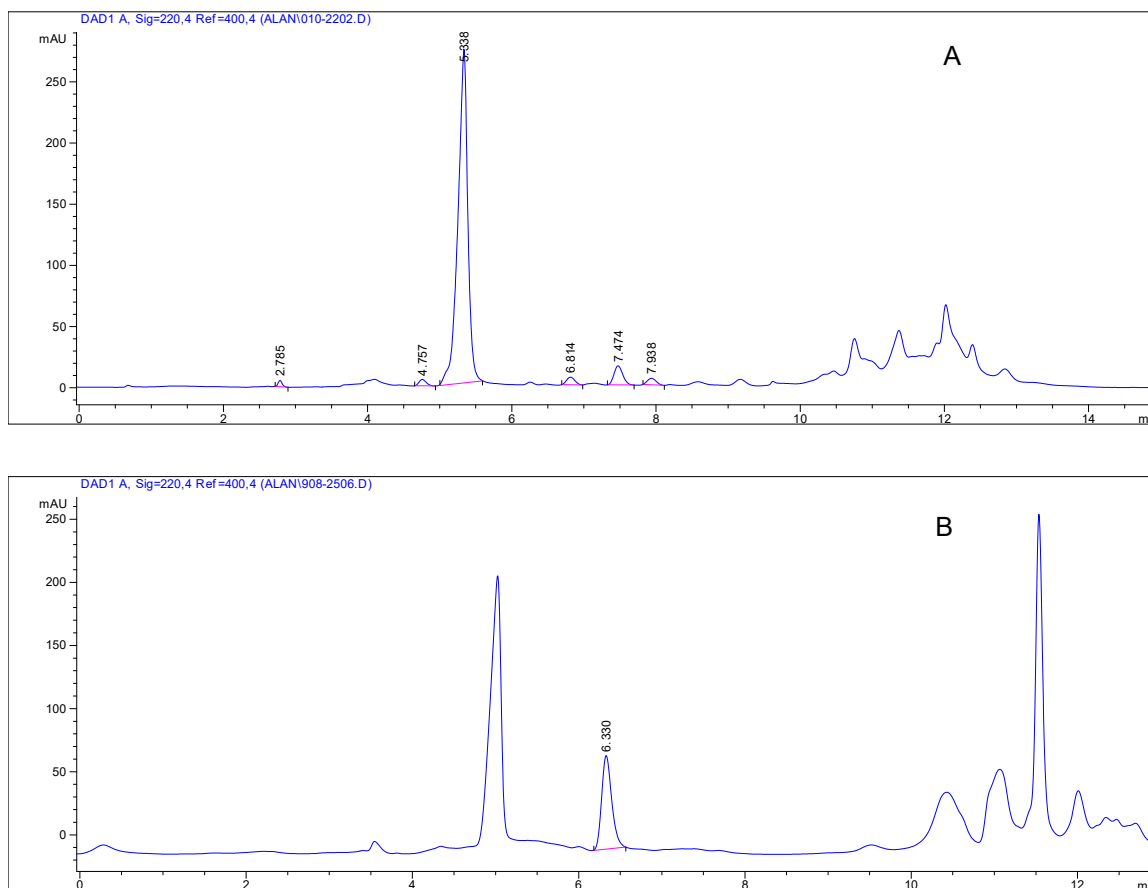


FIGURA 48 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS APÓS PURIFICAÇÃO COM SPE: PICO ALANTOÍNA EM 6,814 MINUTOS COM COMPRIMENTO DE ONDE DE 220 nm (A) E CROMATOGRAMA DE EXTRATO BRUTO RAÍZES APÓS PURIFICAÇÃO COM SPE: PICO ALANTOÍNA EM 6,33 MINUTOS COM COMPRIMENTO DE ONDE DE 220 nm (B).

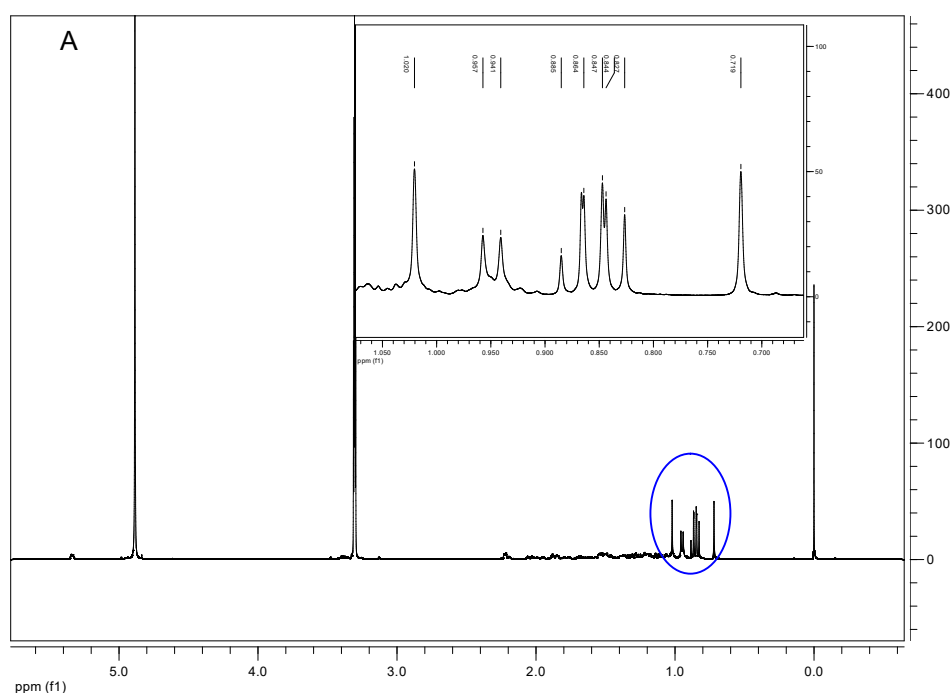
Os extratos de flores, folhas e raízes de *P. venusta* também foram avaliados quantitativamente em relação ao teor de alantoína em função de sua importância farmacológica. Os teores de alantoína encontrados foram de: 0,97% nas flores, 0,09% nas folhas e 1,08% nas raízes para amostras analisadas em duplicata, por calibração externa e após purificação com SPE.

O método por CLAE para identificação e quantificação de alantoína poderá ser empregado, futuramente, no controle de qualidade das matérias-primas flores, folhas e raízes de *P. venusta*.

## 5.5 ANÁLISES DAS FRAÇÕES ACETATO DE ETILA DE FLORES, FOLHAS E RAÍZES

### 5.5.1 Espectros de RMN de $^1\text{H}$ das frações acetato de etila de flores e raízes

As análises através de CCD e RMN de  $^1\text{H}$  foram realizadas nas frações acetato de etila de flores e raízes de *P. venusta*, assim como de padrões de fitoesteróis e triterpenos pentacíclicos. As análises indicaram a presença destas classes de compostos nestas frações. Conforme análise da FIGURA 49A, referente aos hidrogênios das seis metilas do padrão de  $\beta$ -sitosterol, foi possível observar os sinais cujos deslocamentos químicos foram: 0,72; 0,83; 0,84; 0,86; 0,89; 0,94; 1,02 ppm. No espectro de  $^1\text{H}$  da fração acetato de etila das flores (FIGURA 49B) foram observados sinais em 0,70; 0,82; 0,84; 0,86; 0,88; 0,96; 1,03 ppm. Enquanto na fração das raízes (FIGURA 49C), foram encontrados sinais em: 0,68; 0,83; 0,84; 0,86; 0,88; 0,96 e 1,02 ppm. Vale ressaltar que havia em número maior de sinais na região em questão (0,5-1,2 ppm) e tal fato se deve, provavelmente, a presença de outros fitoesteróis presentes nas amostras. Portanto, assim como sugerido na CCD dos extratos brutos de flores e raízes as análises de RMN de  $^1\text{H}$  também sugerem a presença de fitoesteróis em flores e raízes de *P. venusta*.





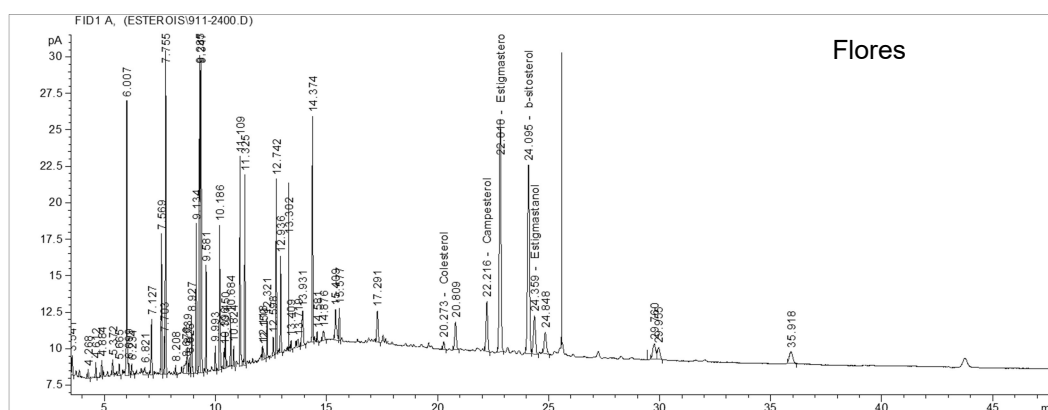


### 5.5.2 Análises por CG-DIC das frações acetato de etila de flores, folhas e raízes

Em função da pequena quantidade disponível das frações de acetato de etila e de as análises por CCD e RMN de  $^1\text{H}$  sugerirem a presença de fitoesteróis e triterpenos pentacíclicos foi realizada a análise por CG-DIC para identificação destas classes de compostos.

A presença dos fitoesteróis nas amostras foi verificada através de comparação de tempos de retenção observados nas amostras com os tempos de retenção de padrões de campesterol, colesterol, estigmasterol, estigmastanol e  $\beta$ -sitosterol e também a fortificação das amostras com estes mesmos padrões. Consequentemente foram identificados todos os esteróides que foram comparados com os padrões nas frações das flores, folhas e raízes.

No cromatograma das flores os picos referentes ao  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol apresentaram-se mais intensos entre os fitoesteróides identificados. Já o colesterol foi o fitoesterol cujo pico apresentou menor intensidade, o que já era de se esperar porque este composto normalmente apresenta-se em pequenas quantidades em plantas (BERHMAN & GOPALAN, 2005). Além disso, é evidente também o grande número de picos que eluíram antes destes fitoesteróides (5 a 18 minutos) (FIGURA 50).



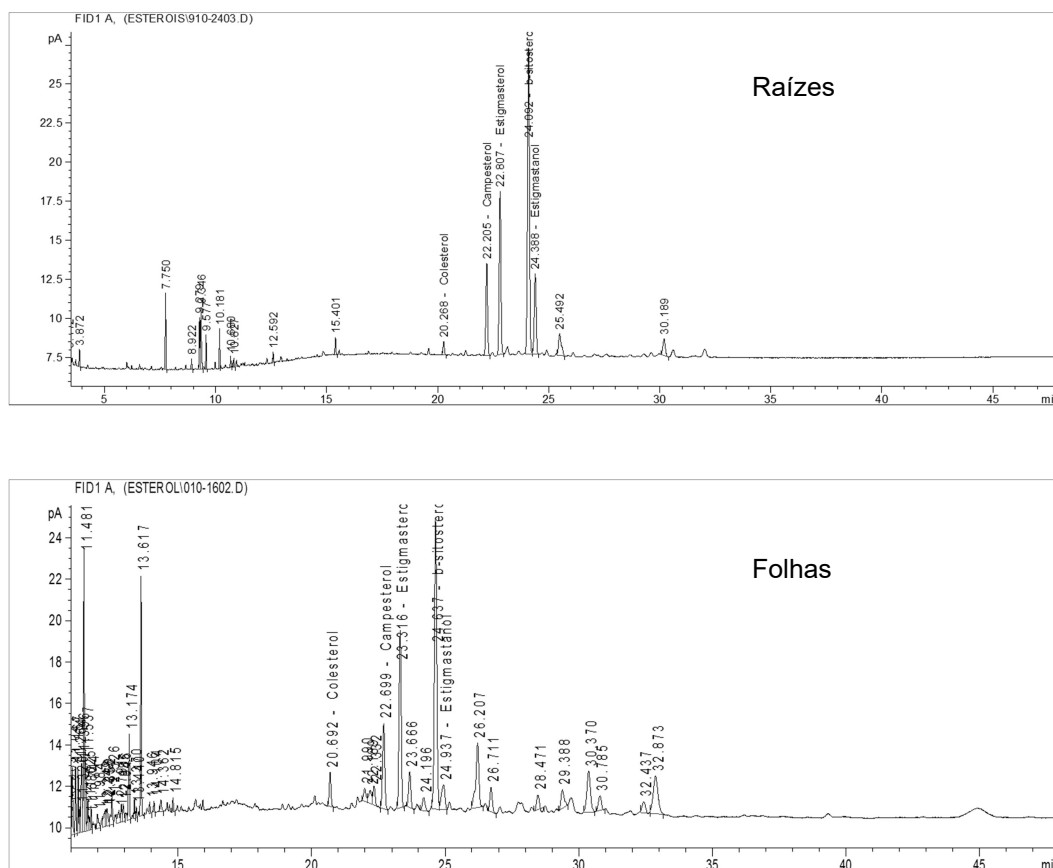


FIGURA 50 – CROMATOGRAMAS DAS FRAÇÕES ACETATO DE ETILA DAS FLORES, RAÍZES E FOLHAS DE *P. venusta* ADQUIRIDO NO SISTEMA GC-DIC. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: 200°C POR 3 MINUTOS E RAMPA DE 10°C POR MINUTOS ATÉ 300°C DE 3 ATÉ 35 MINUTOS. INJETOR E DETECTOR A 325°C. COLUNA CROMATOGRÁFICA: DB-1 DE 30 m X 250  $\mu$ m e 0,25  $\mu$ m DE ESPESSURA DO FILME.

Nas frações acetato de etila de folhas e raízes de *P. venusta*, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol também foram os compostos majoritários entre os fitoesteróides identificados. No entanto, com quantidade menor de compostos entre os tempos de retenção de 5 e 18 minutos quando comparados ao cromatograma das flores.

### 5.5.3 Análises por CG-EM das frações acetato de etila de flores, folhas e raízes

#### 5.5.3.1 Compostos identificados nas flores de *P. venusta*

Na análise por CG-DIC das frações acetato de etila de flores, folhas e raízes foram identificados apenas os compostos cujos padrões estavam disponíveis, portanto, fez-se necessária a utilização de uma ferramenta analítica que possibilitasse a identificação dos outros compostos que eluíram antes dos fitoesteróis ( $tr \cong 5,0$  a 18 minutos).

Os resultados apresentados no cromatograma obtido na análise CG-EM da fração acetato de etila das flores de *P. venusta* (FIGURA 51), mostram duas regiões do cromatograma onde foram identificados compostos. Na primeira delas foram encontrados ácidos graxos (14,4 a 17,1 min.) e na segunda foi confirmada a presença de fitoesteróis (24,8 a 28,1 min.).

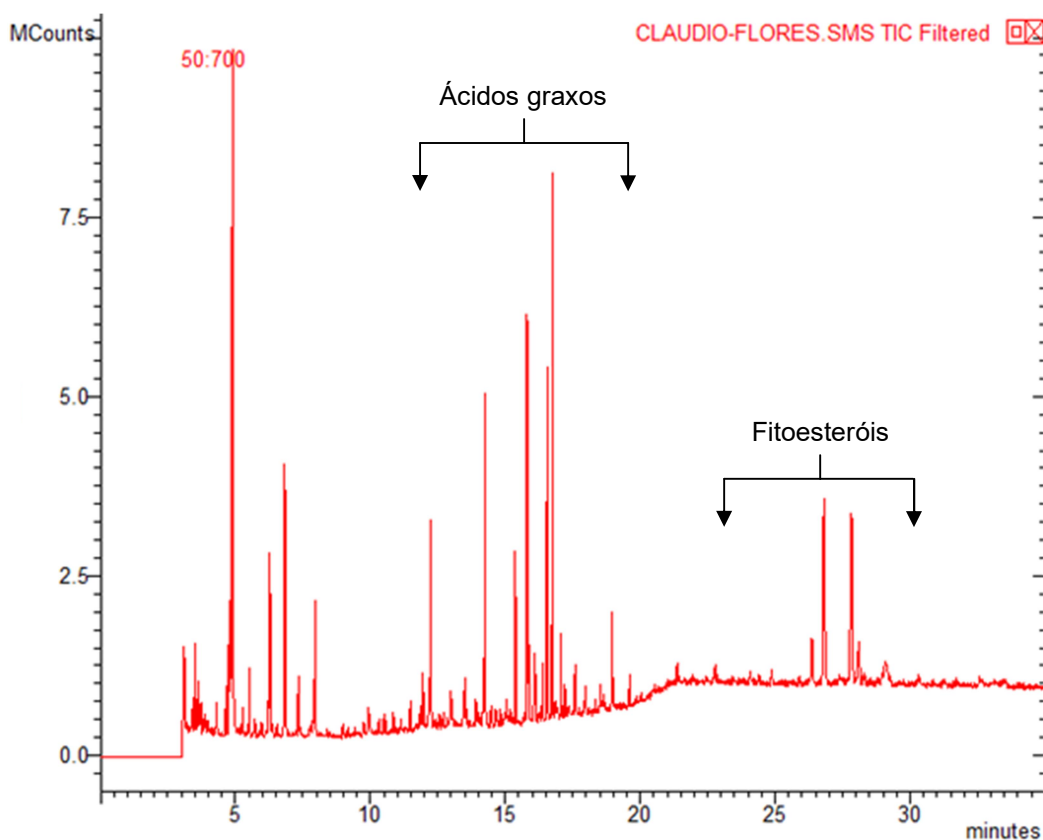


FIGURA 51 – CROMATOGRAMA (TIC) DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FLORES DE *P. venusta*. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: 100°C POR 3 MINUTOS E RAMPA DE 10°C POR MINUTOS ATÉ 280°C DE 3 ATÉ 20 MINUTOS. INJETOR A 300°C. COLUNA CROMATOGRÁFICA: DB-1 DE 30 m X 250  $\mu$ m e 0,25  $\mu$ m DE ESPESSURA DO FILME. DETECTOR SELETIVO DE MASSAS COM IMPACTO ELETRÔNICO (70eV) E AS TEMPERATURAS DO QUADRUPOLO E FONTE DE IONIZAÇÃO IGUAIS A 150°C E 280°C.

Os ácidos graxos foram identificados por meio de comparação de seus espectros de massas e os espectros presentes na biblioteca NIST 5.0. (TABELA 9). Apenas os compostos que apresentaram os maiores valores de fator de similaridade, gerado pela biblioteca NIST, foram considerados como compostos identificados pela técnica de CG-EM. A presença dos fitoesteróis nas flores de *P. venusta* também foi confirmada por meio da comparação dos espectros de massas destes compostos e os espectros de massas dos padrões de primários de campesterol, colesterol, estigmasterol, estigmastanol e  $\beta$ -sitosterol.

TABELA 9 – COMPOSTOS NA FORMA DE ÉSTERES TRIMETILSILILADOS, IDENTIFICADOS NA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FLORES DE *P. venusta*

<b>Pico</b>	<b>TR (min)</b>	<b>Composto</b>	<b>Fator de similaridade</b>	<b>M/M</b>
1	13,529	Acido Tetradecanóico	78%	300
2	14,479	Ácido Pentadecanóico	77%	314
3	15,382	Acido Hexadecanóico	92%	328
4	16,553	Fitol	93%	368
5	16,752	Ácido Fitânico	91%	384
6	17,068	Ácido Octadecanóico	87%	356
7	24,876	Colesterol	88%	458
8	26,371	Campesterol	89%	474
9	26,815	Estigmasterol	92%	484
10	27,819	$\beta$ -sitosterol	75%	486
11	28,096	Estigmastanol	72%	488

NOTA - fator de similaridade – é a percentagem de similaridade entre os espectros dos compostos na amostra e na biblioteca NIST.

Os ácidos graxos palmítico (hexadecanóico) e esteárico (octadecanóico) (FIGURA 54) já haviam sido descritos em sementes de *P. venusta* no trabalho de Pinho e colaboradores (2009).

É a primeira vez que o ácido mirístico (tetradecanóico), o ácido pentadecanóico, fitol, ácido fitânico, colesterol, campesterol, estigmastanol (FIGURA 54) foram identificados em flores de *P. venusta*.

O íon molecular (quando aplicável), os íons fragmentos, e a concentração de cada composto com base na normalização em área são apresentados na TABELA 10.

TABELA 10 – ÍON MOLECULAR, PRINCIPAIS ÍONS FRAGMENTOS E CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NAS FLORES

<b>Pico</b>	<b>Íon molecular/Fragmentos e (Abundância relativa)</b>	<b>Conc.* (%)</b>
1	300 (M+, 5), 286 (10), 285 (45), 129 (40), 117 (97), 75 (87), 73 (63)	0,5
2	314 (M+, 7,5), 300 (10), 299 (47), 145 (5), 129 (41), 117 (99), 75 (65), 73 (51)	0,5
3	328 (M+, 10), 314 (10), 313 (50), 129 (33), 117 (100), 75 (75), 73 (47)	6,1
4	144 (12), 143 (100), 117 (100), 75 (75), 73 (47)	4,4
5	384 (M+, 2), 369 (20), 159 (27), 143 (66), 117 (97), 75 (57), 73 (56), 57 (13)	7,3
6	356 (M+, 11), 341 (50), 201 (3), 129 (50), 117 (98), 75 (72), 73 (55), 55 (10)	2,3
7	458 (M+, 52), 368 (95), 353 (42), 329 (61), 129 (78), 95 (57), 75 (64), 73 (95)	0,3
8	472 (M+, 63), 383 (34), 382 (97), 367 (46), 344 (12), 343 (50), 129 (65), 73 (95)	1,4
9	484 (M+, 62), 394 (55), 255 (55), 129 (56), 105 (40), 83 (90), 73 (98), 55 (69)	6,2
10	486 (M+, 61), 397 (28), 396 (81), 381 (30), 357 (48), 129 (78), 75 (55), 57 (20)	5,9
11	488 (M+, 22), 473 (35), 383 (45), 216 (60), 215 (99), 107 (30), 75 (85), 73 (51)	1,3

NOTA – Picos: 1 – ácido tetradecanóico; 2 – ácido pentadecanóico; 3 – ácido hexadecanóico; 4 – fitol; 5 – ácido fitânico; 6 – ácido octadecanóico; 7 – colesterol; 8 – campesterol; 9 – estigmasterol; 10 –  $\beta$ -sitosterol; 11 – estigmastanol.

\*Conc. (%) – normalização em área considerando-se todos os picos que foram intergrados no cromatograma.

Dentre os ácidos graxos identificados e quantificados, dois são particularmente interessantes: o fitol e o ácido fitânico. O fitol, na verdade, é parte integrante da molécula da clorofila e corresponde quimicamente a um álcool alifático ramificado de cadeia longa ( $C_{20}H_{40}O$ ), ligado à clorofila por uma ligação éster. Uma vez que essa ligação pode ser quebrada em algumas situações, pela clorofilase ou durante o processamento dos vegetais, o fitol, assim liberado, pode

então ser absorvido pelo intestino e posteriormente convertido para ácido fitânico, um ácido graxo ainda pouco conhecido (ácido 3,7,11,15-tetrametilexadecanóico), mas de importantes efeitos biológicos, tais como atividade termogênica em mamíferos e atividade inibidora sobre efeitos teratogênicos do retinol (LANFER-MARQUEZ, 2003).

#### 5.5.3.2 Compostos identificados nas folhas de *P. venusta*

Na análise por CG-EM da fração acetato de etila das folhas de *P. venusta*, assim como das flores, foram identificados nos cromatogramas os ácidos graxos (6,54 a 20,04 min.) e fitoesteróis (24,90 a 27,8 min.) (FIGURA 52).

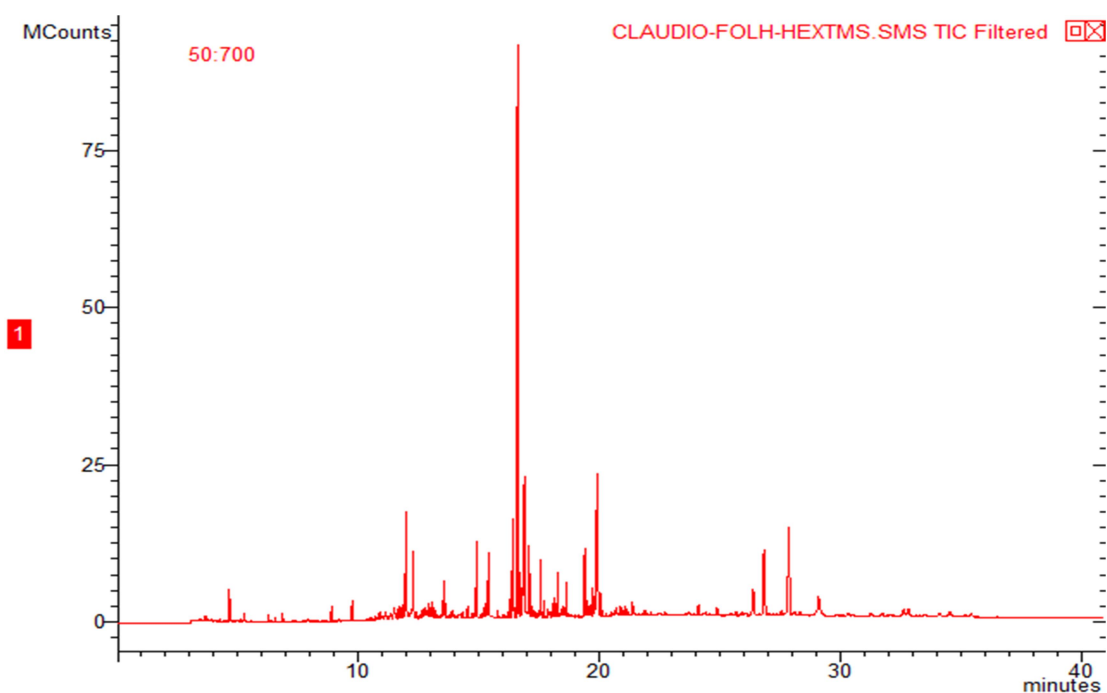


FIGURA 52 – CROMATOGRAMA (TIC) DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE *P. venusta*. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: 100°C POR 3 MINUTOS E RAMPA DE 10°C POR MINUTOS ATÉ 280°C DE 3 ATÉ 20 MINUTOS. INJETOR A 300°C. COLUNA CROMATOGRÁFICA: DB-1 DE 30 m X 250 µm e 0,25 µm DE ESPESSURA DO FILME. DETECTOR SELETIVO DE MASSAS COM IMPACTO ELETRÔNICO (70eV) E AS TEMPERATURAS DO QUADRUPOLO E FONTE DE IONIZAÇÃO IGUAIS A 150°C E 280°C.

Como pode ser observado no cromatograma (FIGURA 52), o que chama a atenção, é a intensidade do pico em 16,7 minutos, identificado como sendo o fitol. A presença desse composto em alta concentração pode ser justificada por se tratar de fração preparada a partir das folhas de *P. venusta*, no qual a concentração de clorofila naturalmente é alta e, o fitol, sendo um derivado da clorofila, aparece também em alta concentração.

TABELA 11 – COMPOSTOS NA FORMA DE ÉSTERES TRIMETILSILILADOS, IDENTIFICADOS NA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE *P. venusta*

Pico	TR (min)	Composto	Fator de similaridade	M/M
1	6,535	Acido Octanóico	86%	216
2	7,890	Ácido Nonanóico	83%	230
3	13,541	Acido Tetradecanóico	88%	300
4	15,387	Acido Hexadecanóico	90%	328
5	16,251	Acido Heptadecanóico	87%	342
6	16,590	Fitol	91%	368
7	16,832	Acido Linoleico	75%	352
8	16,881	Acido $\alpha$ -Linolenico	69%	350
9	17,091	Acido Esteárico	92%	356
10	18,620	Acido Eicosanóico	90%	384
11	20,043	Acido Docosanóico	91%	412
12	24,898	Colesterol	79%	458
13	26,403	Campesterol	85%	474
14	26,846	Estigmasterol	86%	484
15	27,849	$\beta$ -sitosterol	92%	486

NOTA - fator de similaridade – é a percentagem de similaridade entre os espectros dos compostos na amostra e na biblioteca NIST.

Dos quinze compostos identificados na fração acetato de etila das folhas de *P. venusta*, dez são ácidos graxos, sendo que sete deles (ácido octanóico, ácido nonanóico, ácido heptadecanóico, ácido linoleico, ácido  $\alpha$ -linolenico, ácido eicosanóico ou araquídico, ácido docosanóico ou lignocérico – FIGURA 54) não foram encontrados nas flores e é a primeira vez que foram identificados em *P. venusta*.

Vale ressaltar também que, ao contrário do resultado da análise por CG-DIC, onde foi detectada a presença do fitoesterol estigmastanol, a análise por CG-EM das folhas de *P. venusta* não detectou este composto.



TABELA 12 – ÍON MOLECULAR, PRINCIPAIS ÍONS FRAGMENTOS E CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NAS FOLHAS

<b>Pico</b>	<b>Íon molecular/Fragmentos e (Abundância relativa)</b>	<b>Conc.* (%)</b>
1	216 (M+, 2), 201 (38), 117 (57), 75 (98), 73 (55)	0,3
2	230 (M+, 1), 215 (52), 117 (66), 75 (99), 73, (61), 55 (8)	0,2
3	300 (M+, 10), 285 (46), 129 (46), 117 (98), 75 (61), 73 (50)	0,9
4	328 (M+, 11), 313 (25), 201 (4), 129 (42), 117 (98), 75 (46), 73 (38)	0,5
5	342 (M+, 11), 327 (38), 201 (4,5), 117 (95), 75 (80), 73 (70), 55 (15)	0,6
6	143 (98), 95 (15), 73 (25), 57 (35)	21,69
7	352 (M+, 1,5), 337 (9), 129 (45), 95 (69), 81 (76), 75 (98), 73 (75)	1,8
8	350 (m+, 5), 335 (21), 107 (53), 95 (100), 75 (50), 73 (42), 55 (20)	4,2
9	356 (M+, 15), 341 (25), 201 (4), 129 (46), 117 (90), 75 (60), 73 (47)	2,1
10	369 (36), 201 (3), 129 (50), 117 (58), 75 (48), 73 (45), 55 (14)	0,8
11	412 (M+, 33), 397 (34), 145 (10), 129 (51), 117 (97), 75 (74), 73 (56)	0,6
12	458 (M+, 40), 368 (90), 353 (30), 329 (48), 129 (50), 75 (50), 73 (99)	0,4
13	472 (M+, 40), 382 (91), 367 (30), 343 (59), 129 (55), 73 (98)	1,5
14	484 (M+, 88), 394 (62), 255 (71), 213 (30), 81 (96), 55 (58)	4,6
15	486 (M+, 66), 396 (92), 357 (56), 255 (36), 215 (10), 129 (85), 73 (98)	6,1

NOTA – Picos: 1 – ácido octanóico; 2 – ácido nonanóico; 3 – ácido tetradecanóico; 4 – ácido hexadecanóico; 5 – ácido heptadecanóico; 6 – fitol; 7 – ácido linoleico; 8 – ácido  $\alpha$ -Linolenico; 9 – ácido esteárico; 10 – ácido eicosanóico; 11 – ácido docosanóico; 12 – colesterol; 13 – campesterol; 14 – estigmasterol; 15 –  $\beta$ -sitosterol.

\*Conc. (%) – normalização em área considerando-se todos os picos que foram intergrados no cromatograma.

### 5.5.3.3 Compostos identificados nas raízes de *P. venusta*

Na análise CG-EM da fração acetato de etila das raízes de *P. venusta* (FIGURA 53) foram identificados no cromatograma vários ácidos graxos (7,91 a 21,38 min.) e fitoesteróis (24,90 a 27,9 min.).

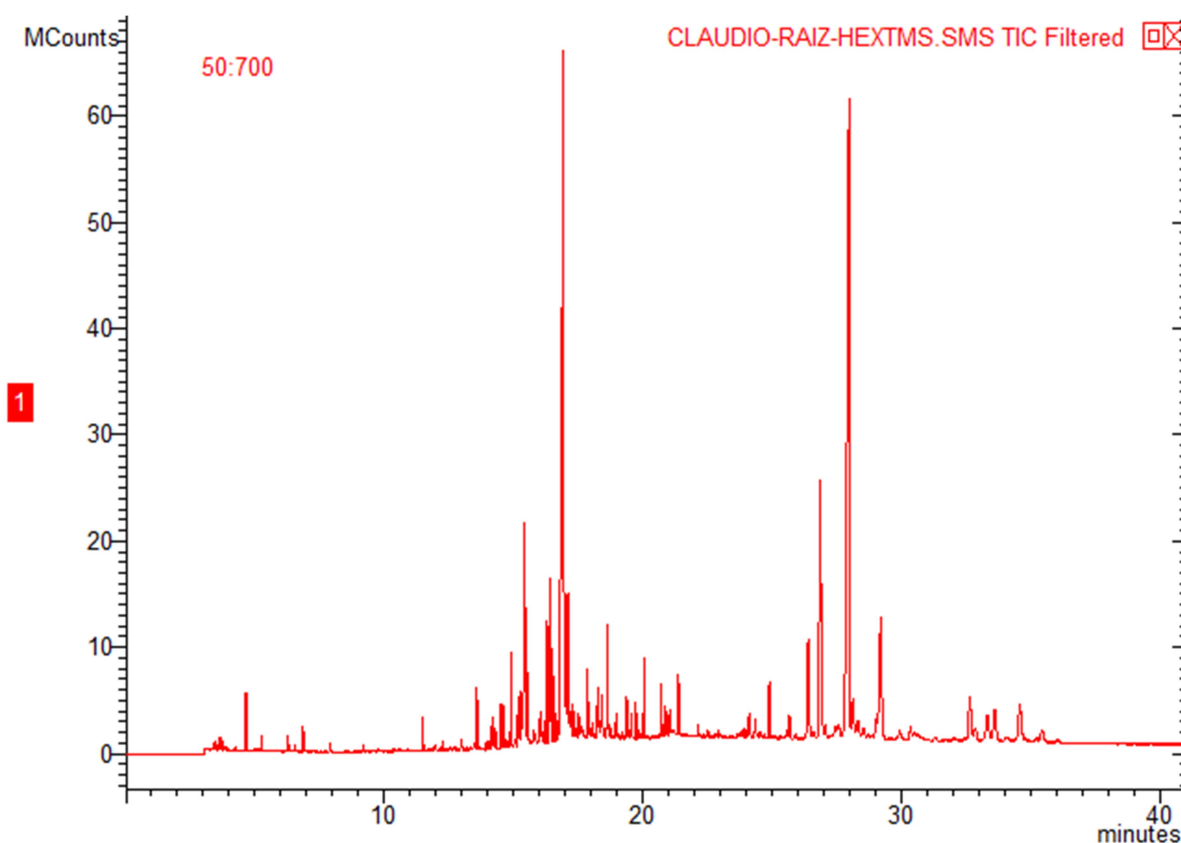


FIGURA 53 – CROMATOGRAMA (TIC) DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS RAÍZES DE *P. venusta*. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: 100°C POR 3 MINUTOS E RAMPA DE 10°C POR MINUTOS ATÉ 280°C DE 3 ATÉ 20 MINUTOS. INJETOR A 300°C. COLUNA CROMATOGRÁFICA: DB-1 DE 30 m X 250 µm e 0,25 µm DE ESPESSURA DO FILME. DETECTOR SELETIVO DE MASSAS COM IMPACTO ELETRÔNICO (70eV) E AS TEMPERATURAS DO QUADRUPOLO E FONTE DE IONIZAÇÃO IGUAIS A 150°C E 280°C.

Dentre os compostos identificados no cromatograma da FIGURA 53, o pico com tempo de retenção de 27,983 min. é o majoritário, sendo que este composto foi identificado como  $\beta$ -sitosterol (TABELA 13). Este composto já fora relatado nas raízes de *P. venustano* trabalho de Ferreira e colaboradores (1999).

TABELA 13 – COMPOSTOS NA FORMA DE ÉSTERES TRIMETILSILILADOS, IDENTIFICADOS NA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS RAÍZES DE *P. venusta*

<b>Pico</b>	<b>TR (min)</b>	<b>Composto</b>	<b>Fator de similaridade</b>	<b>M/M</b>
1	7,908	Acido Nonanóico	88%	230
2	9,176	Acido Decanóico	86%	244
3	11,481	Acido Dodecanóico	92%	272
4	13,532	Acido Tetradecanóico	90%	300
5	14,491	Acido n-Pentadecanóico	83%	314
6	15,157	Ácido Palmitoleico	91%	326
7	15,379	Acido Palmítico	93%	328
8	16,253	Ácido Heptadecanóico	90%	342
9	16,580	Fitol	85%	368
10	17,862	Ácido Nonadecanóico	84%	370
11	18,608	Acido Eicosanóico	87%	384
12	20,042	Acido Docosanóico	90%	412
13	21,383	Tretacosanóico	77%	440
14	24,881	Colesterol	75%	458
15	26,397	Campesterol	78%	474
16	26,875	Estigmasterol	84%	484
17	27,983	$\beta$ -sitosterol	90%	486

NOTA - fator de similaridade – é a percentagem de similaridade entre os espectros dos compostos na amostra e na biblioteca NIST.

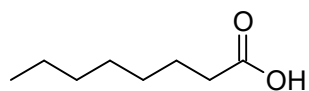
Dezessete compostos foram identificados na fração acetato de etila das raízes de *P. venusta*, treze são ácidos graxos, sendo que cinco deles (ácido decanóico ou cáprico, ácido dodecanóico ou laurico, ácido palmitoleico, ácido nonadecanóico, ácido tretacosanóico ou lignocérico – FIGURA 54) não foram identificados nas amostras de flores e folhas e pela primeira vez estão sendo relatados na espécie.

TABELA 14 – ÍON MOLECULAR, PRINCIPAIS ÍONS FRAGMENTOS E CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NAS RAÍZES.

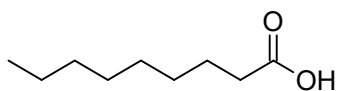
<b>Pico</b>	<b>Íon molecular/Fragmentos e (Abundância relativa)</b>	<b>Conc. * (%)</b>
1	230 (M+, 1), 215 (45), 117 (71), 75 (98), 73, (72), 55 (7,5)	0,10
2	229 (50), 117 (76), 73 (62), 55 (8)	0,10
3	272 (M+, 3), 257 (55), 117 (100), 75 (89), 73 (64), 55 (10)	0,33
4	300 (M+, 10), 286 (12), 285 (57), 129 (40), 117 (98), 75 (82), 73 (55)	0,47
5	314 (M+, 6), 300 (13), 299 (52), 129 (50), 117 (95), 75 (78), 73 (66), 55 (12)	0,33
6	326(M+, 3), 312 (6), 311 (30), 145 (7), 129 (66), 117 (82), 75 (100), 73 (68)	0,31
7	328 (M+, 12), 314 (11), 313 (43), 145 (5), 129 (48), 117 (98), 75 (65), 73 (50)	1,23
8	342 (M+, 13), 328 (6), 327 (33), 201 (6), 129 (48), 117 (98), 75 (60), 73 (45),	1,29
9	143 (98), 95 (20), 75 (32), 73 (66), 57 (8)	0,72
10	370 (M+, 11), 356 (16), 355 (38), 129 (43), 117 (98), 75 (65), 73 (60), 55 (23)	0,60
11	384 (M+, 15), 369 (30), 201 (6), 129 (47), 117 (98), 75 (55), 73 (50), 55 (12)	1,28
12	412 (M+, 33), 398 (8), 397 (25), 145 (12), 129 (45), 117 (97), 75 (60), 73 (55)	0,79
13	440 (M+, 38), 426 (18), 425 (38), 145 (10), 129 (50) 117 (100), 75 (53), 73 (54)	0,62
14	458 (M+, 33), 368 (90), 353 (32), 329 (46), 255 (28), 129 (52), 95 (42)	0,94
15	472 (M+, 47), 383 (15), 382 (50), 367 (20), 344 (15), 343 (38), 129 (52), 73 (98)	2,65
16	484 (M+, 97), 395 (23), 394 (47), 255 (57), 129 (54), 95 (32), 83 (80)	6,85
17	486 (M+, 55), 397 (35), 396 (98), 357 (59), 215 (14), 129 (75), 75 (53), 73 (43)	22,36

NOTA – Picos: 1 - ácido nonanóico, 2 – ácido decanóico; 3 – ácido dodecanóico; 4 – ácido tetradecanóico; 5 – ácido n-Pentadecanóico; 6 – ácido palmitoleico; 7 – ácido palmítico; 8 – ácido heptadecanóico; 9 – fitol; 10 – ácido nonadecanóico; 11 – ácido eicosanóico; 12 – ácido docosanóico; 13 – ácido tetracosanóico; 14 – colesterol; 15 – campesterol; 16 – estigmasterol; 17 –  $\beta$ -sitosterol.

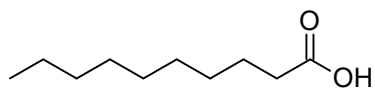
\*Conc. (%) – normalização em área considerando-se todos os picos que foram intergrados no cromatograma.



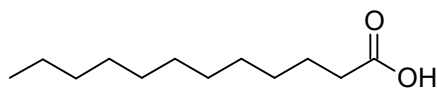
Ácido Octanóico



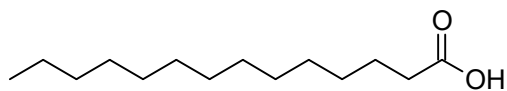
Ácido Nonanóico



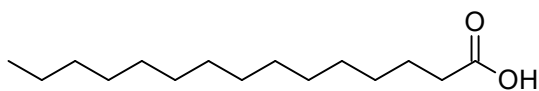
Ácido Decanóico



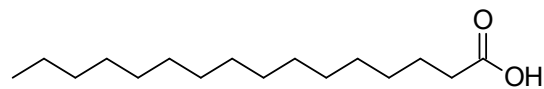
Ácido Dodecanóico



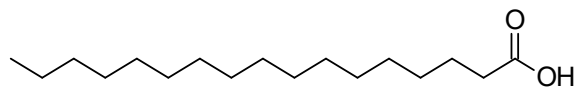
Ácido Tetradecanóico



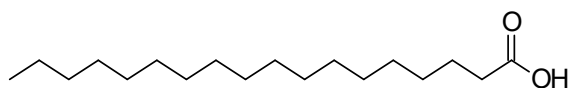
Ácido Pentadecanóico



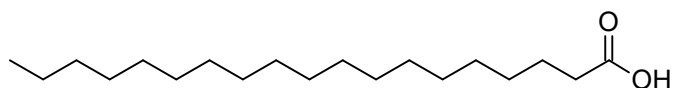
Ácido Hexadecanóico



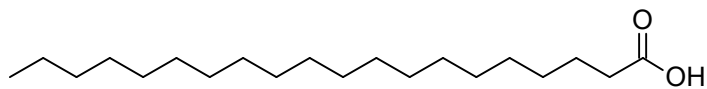
Ácido Heptadecanóico



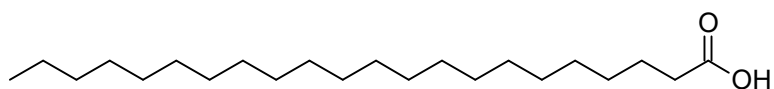
Ácido Octadecanóico



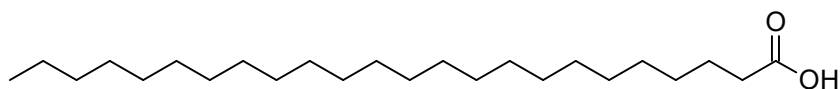
Ácido Nonadecanóico



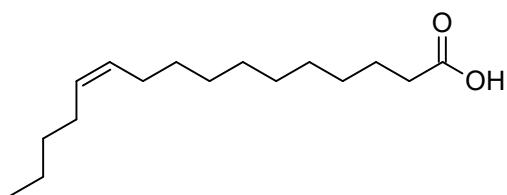
Ácido Eicosanóico



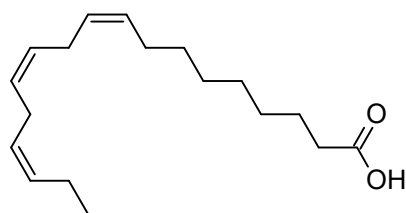
Ácido Docosanóico



Ácido Tetracosanóico



Ácido Palmitoleico

Ácido  $\alpha$ -Linolênico

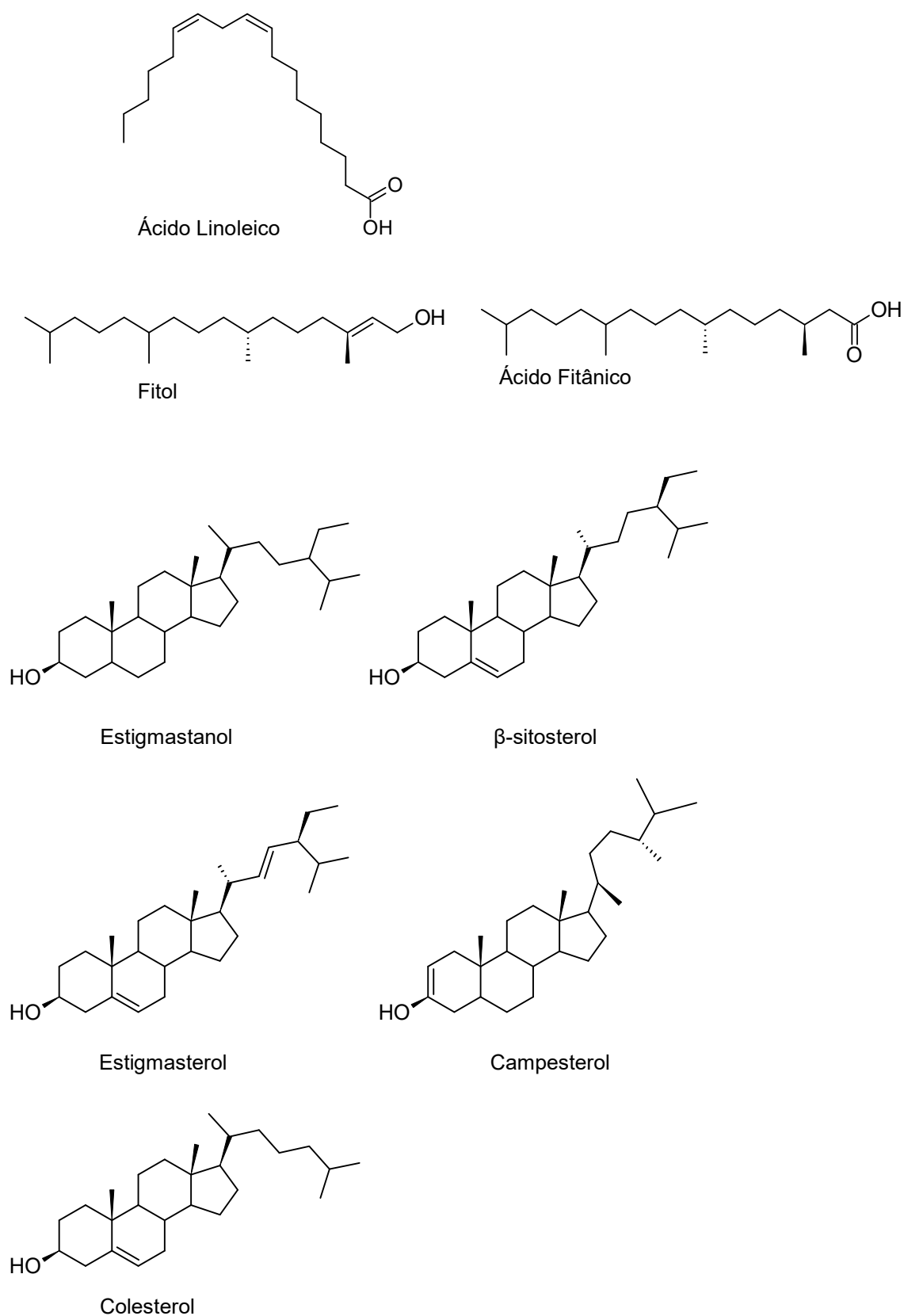


FIGURA 54 – COMPOSTOS IDENTIFICADOS NAS FRAÇÕES ACETATO DE ETILA DAS FLORES, FOLHAS E RAÍZES DE *P. venusta*.

## 6 CONCLUSÕES

Entre as técnicas de extração não exaustivas empregadas para obtenção dos extratos de *P. venusta*, a turbólise foi mais eficiente que a maceração dinâmica. Além disso, a turbólise foi quantitativamente superior na extração dos compostos bioativos presentes em todas as partes da *P. venusta* investigadas com tempo de extração bastante reduzidos. A utilização da turbólise para obtenção de tinturas tem grande aplicabilidade industrial porque é um método de extração onde o equilíbrio soluto/solvente extrator é atingido rapidamente e sem a necessidade de aquecimento, o que minimiza a possibilidade de degradação de compostos termolábeis.

Da fração etanólica das flores de *P. venusta*, foram isolados e caracterizados os compostos verbascosídeo, rutina, isoquercetrina, nicotiflorina e alantoína (somente caracterizada). Desta parte da planta, a análise por CG-EM da fração acetato de etila, permitiu a identificação dos fitoesteróis  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, estigmastanol, campesterol e colesterol, além dos ácidos graxos palmítico e esteárico que já haviam sido descritos em sementes de *P. venusta*. Além destes, foram identificados pela primeira vez o ácido mirístico, o ácido pentadecanóico, fitol e o ácido fitânico.

Da fração metanólica das folhas de *P. venusta*, foi isolada e caracterizada a rutina e a alantoína foi somente caracterizada. Desta parte da planta, a análise por CG-EM da fração acetato de etila, permitiu a identificação dos fitoesteróis  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, estigmastanol, campesterol e colesterol e os ácidos graxos octanóico, nonanóico, mirístico, palmítico, heptadecanóico, linoléico,  $\alpha$ -linolênico, esteárico, eicosanóico, docosanóico e fitol.

Da fração metanólica das raízes de *P. venusta*, foram isolados e caracterizados o verbascosídeo e a alantoína (somente caracterizada). Por meio da análise por CG-EM, identificou-se os mesmos esteróides encontrados nas flores, exceto o estigmastanol. Ao todo foram identificados 11 ácidos graxos da fração acetato de etila das raízes de *P. venusta*, entre os quais: ácido decanóico, ácido laurico, ácido palmitoleico, ácido nonadecanóico, ácido tetracosanóico

A caracterização de compostos nas frações etanólica e metanólica de flores e raízes, demonstra o potencial e o sucesso da aplicação da Ressonância

Magnética Nuclear na identificação de compostos diretamente em extratos brutos e frações semi-purificadas de considerável complexidade.

A utilização de CLAE semi-preparativa no isolamento de compostos representou uma etapa do trabalho que demandou testes para otimização do método de separação; estabelecimento das condições ideais de sobrecarga da coluna semi-preparativa e otimização das condições de coleta das frações na purificação dos compostos. É importante ressaltar também que esta etapa de isolamento foi fundamental para obtenção dos compostos puros que servirão de substratos para os testes farmacológicos de produção de melanina *in vitro*. Além disso, os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos compostos isolados por CLAE nos permitiu inferir que estes compostos apresentavam considerável pureza, o que confirma o sucesso desta ferramenta analítica no isolamento de produtos naturais.

Os compostos verbascosideo isoquercetrina, nicotiflorina estão sendo descritos pela primeira vez no gênero *Pyrostegia*, em particular, na espécie *P. venusta*. Também é a primeira vez que é relatada a presença de alantoína em flores e folhas de *P. venusta*.

No que diz respeito aos ensaios farmacológicos, extratos brutos de flores e folhas, obtidos por turbólise de *P. venusta* apresentaram atividade farmacológica no ensaio de produção espontânea de melanina *in vitro*. Os resultados de atividade da enzima tirosinase para as folhas de *P. venusta*, indicaram uma via (ou mecanismo de ação) através da qual acontece o aumento da produção espontânea de melanina.

Os ensaios farmacológicos das flores e folhas, em particular aqueles de estímulo de produção de melanina *in vitro*, são inéditos e promissores para investigações farmacológicas posteriores, além de ratificarem a utilização das flores na medicina popular. Além disso, estes resultados preliminares sugerem a necessidade de estudos farmacológicos mais aprofundados no sentido de elucidar mecanismos de ação dos compostos isolados e de investigar a eficiência de preparações padronizadas no tratamento de vitiligo.



## 7 REFERÊNCIAS

- ABE, F.; NAGAO, T.; OKABE, H. Antiproliferative constituents in plants. Aerial parts of *Lippia dulcis* and *Lippia canescens*. *Biol. Pharm. Bull.*, **25**(7): 920, 2002.
- AGNOLET, S.; JAROSZEWSKI, J.W.; VERPOORTE, R.; STAERK, D. <sup>1</sup>H NMR-based metabolomics combined with HPLC-PDA-MS-SPE-NMR for investigation of standardized *Ginkgo biloba* preparations. *Metabolomics*, **6**: 292, 2010.
- ANDERSON, D.; SHMID T.E.; BAUMGARTNER, A.; CEMELLI-CARRATALA, E.; BEINKWORTH, M.H.; WOOD J.M. Oestrogenic Compounds And Oxidative Stress (In Human Sperm And Lymphocytes In The Comet Assay). *Mutat. Res.*, **544**: 173, 2003.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC n.º 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União; Poder Executivo, publicado no dia 05 de abril de 2010.
- ANDARY, C.; WILDE, R.; LAFFITE, C.; PRIVAT, G.; WINTERNITZ, F. Structures of Verbascosideo and Orobanchosideo, Cafeic acid sugar esthers from *Orobanche Rapum-Genistae*. *Phytochem.*, **21**(5): 1123, 1982.
- AZAMBUJA, R. Tratamento do vitiligo. *Brasília Méd.*, **18**: 69, 1981.
- BERHMAN, E.J.; GOPALAN, V. Cholesterol and plants. *J. Chem. Edu.*, **82**: 1790, 2005.
- BERTHEMY, A.; NEWTON, J.; WU, D.; BUHRMAN, D. Quantitative determination of an extremely polar compound allantoin in human urine by LC-MS/MS based on the separation on a polymeric amino column. *J. Pharm.Biomed. Anal.*, **19**: 429, 1999.
- BLATT, C.T.T.; SANTOS, M.D. & SALATINO, A. Flavonoids of Bignoniaceae from the cerrado and their possible taxonomic significance. *Pl. Syst. Evol.*, **210**: 289, 1998.
- BRAY, H.G.; THORPE, W.V. Analysis of Phenolic Compounds of Interest in Metabolism. *Meth. Biochem. Anal.* **1**: 27, 1954.
- CARPINELLA, M.C.; ANDRIONE, D. G.; RUIZ, G.; PALACIOS, S. M. Screening for Acetylcholinesterase Inhibitory Activity in Plant Extracts from Argentina. *Phytother. Res.* **24**: 259, 2010.
- CHRISTOPHORIDOU, S.; DAIS, P.; TSENG, L.H.; SPRAUL, M. Separation and Identification of Phenolic Compounds in olive oil by coupling high performance liquid chromatography with post column solid-phase extraction to nuclear magnetic resonance spectroscopy (LC-SPE-NMR). *J. Agric. Food Chem.*, **53**(12): 4667, 2005.

COSTA, D.A.; SILVA, D.A.; CAVALCANTI, A.C.; MEDEIROS, M.A.A.; LIMA, J.T.; CAVALCANTE, J.M.S.; SILVA, B.A.; AGRA, M.F.; DE SOUZA, M.F.V. Chemical constituents from *Bakeridesia pickelli* Monteiro (*malvaceae*) and the relaxant activity of kaempferol-3-O- $\beta$ -D-(6''-E-p-coumaroyl) glucopyranose on Guinea-pig ileum. *Quim. Nova*, **30**(4):901, 2007.

DA SILVA, G.C.; VALENTE, L.M.M.; PATITUCCI, M.L.; PINTO, A.C. Diterpenóides com esqueleto cleistanano de *Vellozia* aff. *carunculares* Martius exseubert (*velloziaceae*). *Quim. Nova*, **24**(5):619, 2001.

DA SILVA, M. C.; FONTES, H. A. Natural treatment for veiling: results of an open study on 789 patients. *Junior J. Eur. Ac. Dermatol. and Dendrol.*, **8**: 149, 1997.

DE SAMPAIO, E. S.; Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná: Paraná, 1991.

DE SOUZA, L.M.; CIPRIANE, T.R.; SERRATO, R.V.; DA COSTA, D.E.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.; SASSAKI, G.L. Analysis of flavonol glycoside isomers from leaves of *Maytenus ilicifolia* by off-line and on-line high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1207**: 101, 2008.

DESMICHELLE, G. **O medicamento homeopático: fabricação, controle, legislação.** In: MERCIER, L. (ORG.). Homeopatia princípios básicos. São Paulo: Organização Andrei, 1987.

DINDA, B.; DE, U.C.; BHATTACHARYA, S.; ARIMA, S.; SATO, N.; HARIGAYA, Y. Chemical Constituents of *Argyrea argentea*, *Millingtonia hortensis* and *Pyrostegia venusta*. *J. Indian Chem. Soc.*, **79**: 291, 2002.

DUBEY, R.; MISRA, K. Chemical components of *Pyrostegia venusta* flowers. . *J. Indian Chem. Soc.*, **53**: 378, 1976.

FARMACOPEIA AMERICANA, 29.Ed. 2973. 2006.

FARMACOPEIA EUROPEIA, 6. Ed. Concil of Europe. 1027, 2008.

FERREIRA, D. T.; ALVARES, P. S. M.; HOUGHTON, P. J.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes Químicos das Raízes de *Pyrostegia venusta* e Considerações sobre a sua Importância Medicinal. *Quím. Nova*, **23**(1): 42, 2000.

FUNES, L.; FERNANDES-ARROYO, S.; LAPORTA, O.; PONS, A.; ROCHE, E.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNANDEZ-GUTIERREZ, A.; MICOL, V. Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of lemon verbena extract. *Food Chem.*, **117**: 589, 2009.

GAWKRODGER, D.J.; ORMEROD, A.D.; SHAW, L.; MAURI-SOLE, I.; WHITTON, M.E.; WATTS, M.J.; ANSTEY, A.V. INGHAM, J.; YOUNG, K. Guideline of diagnosis and management of vitiligo. *British J. Dermatol.*, **159**: 1051, 2008.

GONZALEZ, S.; PATHAK, M.A.; CUEVAS, J.; VILLARUBIA, V.G.; FITZPATRICK, T.B. Topical or oral administration with an extract of *Polypodium leucotomos* prevents acute sunburn and psoralen- induced phototoxic reactions as well as depletion of Langerhans cells in human skin. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **13**(1): 50, 1997.

GOWDA, D.C.; ANJANEYALU, Y.V. Sugar composition of nectar in *Pyrostegia venusta*. *Curr. Sci.*, **48**(9): 398, 1979.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A. E.; JUAREZ, A. Q.; PELZER, L. E., Anti-inflammatory properties plant flavonoids. Effect of rutin, quercetin and hiperidin on adjuvant arthritis in rat. *Pharmacology*, **56**: 683, 2001.

HAN, Y. Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. *Int. Immunopharmacol.*, **9**: 207, 2009.

HASLER, A.; MEIER, B.; STICHER, O. HPLC analysis of 5 widespread flavonoid aglycones. *Planta Med.*, **55**: 616, 1989.

HEARING, V.J.; TSUKAMOTO, K. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* **5**: 2902, 1991.

HUBER, U.; MAJORS, R.E. **Principles in Preparative HPLC – Primer**. Agilent Technologies, Palo Alto, California, 2004.

HYUN, S.K.; LEE, W.H.; JEONGDA, M.; KIM, Y. and CHOI, J.S. Innibitory effects of Kurarinol, Kuradinol and trifoeirhizen from *Sophora flavescens* on tyrosinase and melanin synthesis. *Biol. Pharm. Bull.*, **31**:154, 2008.

JANG, J.Y.; LEE, J.H.; KANG, B.W.; CHUNG, K.T.; CHOI, Y.H.; CHOI, B.T. Dichloromethane fraction of *Cimicifuga heracleifolia* decreses de level of melanin synthesis by activating the ERK or AKT signaling in B16F10 cells. *Exp. Dermatol.*, 2008.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant systematics – a phylogenetic approach**. Ed. Sinauer, Sunderland, 1999.

KAVLI, G. Phototoxicity from furocoumarins (psoralens) of *Heracleum laciniatum* in a patient with veiling. Action spectrum studies on bergapten, pimpinellim, angelicin and sphondin. *Contact Dermatitis*, **9**(5): 364, 1983.

KIM, J.H.; BAEK, S.H.; KIM, D.H.; CHOI, T.Y.; YOON, T.J.; HWANG, J.S.; KIM, M.R.; KWON, H.J.; LEE, C.H. Downregulation of melanin synthesis by Hagunin A and its application to in vivo lightening model. *J. Invest. Dermatol.*, **128**: 1227, 2008.

KRISNA, V.; SHARNA,S.; PAREEK, R.B. & SINGH, P. Terpenoid constituents from some indigenous plants. *J. Indian Chem. Soc.*, **79**: 550, 2002.

KOVACS, S.O. Veiling. *J. Am. Acad. of Dermatol.*, **38** (5): 647, 1998.

LANFER-MARQUEZ, U. M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. *Rev. Bras. de Cien. Farm.*, **39**(3): 227, 2003.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O.; NOGUEIRA, T.C.M.L. **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais**. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre / Florianópolis: Universidade /UFRGS / UFSC, 2000.

LEÃO, A. R.; DA CUNHA, L. C.; PARENTE, L. M. L.; CASTRO, L. C. M.; CHAUL, A.; CARVALHO, H. E.; RODRIGUES, V. B.; BASTOS, M. A. Avaliação Clínica Toxicológica Preliminar do Viticromin® em Pacientes com Vitiligo. *Rev. Eletr. Farm.*, **2**(1): 15, 2005.

LEE, H.B.; KIM, E.K.; PARK, S.J.; BANG, S.G.; KIM, T.G.; CHUNG, D.W. Isolation and Characterization of Nicotiflorin obtained by Enzymatic Hydrolysis of two Precursors in Tea Seed Extract. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 4808, 2010.

LI, W.; YU, W.; DONG, Q.; WANG, P.; CHEN, Q. A complex prescription for veiling activates mitochondrial ATP synthase- 6 expression in B-16 murine melanoma cells. *J. Ethnopharmacol.*, **92** (2-3): 193, 2004.

LIMA NETO, J.S.; GRAMOSA, N.V.; SILVERA, E.R. Constituintes químicos dos frutos de *Copaifera langsdorffii* Desf. *Quím. Nova*, **31**(5): 1078, 2008.

LIN, Z.; HOULT J.; RAMAN, A. Sulphorhodamine B assay for measuring proliferation of a pigmented melanocyte cell line and its application to the evaluation of crude drugs used in the treatment of vitiligo. *J. Ethnopharmacol.*, **66** (2): 141, 1999.

LIST, P.H.; SCHMIDT, P.C. **Phytopharmaceutical Technology**. CRC Press Inc.: Florida, 1989.

LIU, M.; LI, J.; GUO, H.; LEE, K.; Qin, L.; CHAN, K. The effects of verbascoside on plasma lipid peroxidation level and erythrocyte membrane fluidity during immobilization in rabbits: a time course study. *Life Sci.*, **73**: 883, 2003.

LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil**, Nova Odessa: São Paulo, p. 81, 1982.

MACHADO, H., **Atividade dos flavonóides rutina e naringina sobre o tumor ascítico de Erlich “in vivo”**. 2006. 125f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2005.

MAGALHÃES, E.A.; SILVA JÚNIOR, G. J.; DE CAMPOS, T.A.; SILVA, L.P.; SILVA, R.M.G. Avaliação do potencial genotóxico do extrato bruto de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers, *Bignoneaceae*, em medula óssea de camundongos. *Braz. J. Pharmacog.*, **20**(1): 65, 2010.

MARTELANC, M.; VOVK, I.; SIMONOVSKA, B. Determination of three major Triterpenoids in epicuticular wax of cabbage (*Brassica oleracea* L.) by HPLC with UV and Mass Spectrometry detection. *J. of Chromatography A*, **1164**: 145, 2007.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas Medicinais**, 5ª ed., UFV, Viçosa, p. 182, 2003.

MIDDLETON, E. JR.; KANDASWAM, C.; THEOHARIDES, T. C., The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.*, **53**: 673, 2000.

MONDAL A. K.; MONDAL S.; MANDAL S. The free amino acids of pollen of some angiospermic taxa as taxonomic markers for phylogenetic interrelationships. *Curr. Sc. India*, **96**(8): 1071, 2009.

MOU, K.H.; ZANG, XQ; YU, B; ZANG, ZL; FENG, J. Promoting of melanocyte adhesion and migration by *Malytea scurfpea* fruit in vitro. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.*, **26**(3): 167, 2004.

NASSIRI-ALS, M.; SHARIATI-RAD, S.; ZAMANSOLTAN, F., Anticonvulsive effects of intracerebroventricular administration of rutin in rats. *Progr Neuro-Psychoph.*, **32**: 989, 2008.

NIASSY, B.; UM, B.H.; LOBSTEIN,A.; WENIGER, B.; KONÉ, M.; ANTON, R. Flavonóides de *Tephrosia deflexa* et *Tephrosia albifoliolis*. *C.R. Chim.*, **7**: 993, 2004.

NICOLAIDOU, E.; ANTONIOU, C.; STRATIGOS, A.; KATSAMBAS, A.D. Narrow band ultraviolet phototherapy and 308 nm excimer laser in the treatment of vitiligo: A review. *J. Amer. Acad.Dermatol.*, **60**(3): 470, 2009.

NJOO, M.D.; WESTERHOT, W.; BOS, J.D.; BOSSUYT, P.M. The development of guidelines for the treatment of vitiligo. *Arch. Dermatol.*, **135**: 1514, 1999.

OBIED, H.K.; PRENZLER, P.D.; ROBARDS, K. Potent antioxidant biophenols from olive mill waste. *Food Chem.*, **111**: 171, 2008.

OHNO, T.; INOUE, M.; OGIHARA, Y.; SARACOGLU, I. Antimetastatic activity of acteoside, a phenylethanoid glycoside. *Biol. Pharm. Bull.*, **25**(5): 666, 2002.

PARAVAR, T.; LEE, D.J. Vitiligo in an urban academic setting. *Int. J. Dermatol.*, **49**: 39, 2010.

PARSAD, D; PANDHI, R; JUNEJA, A. Effectiveness of oral *Ginko biloba* in treating limited, slowly spreading vitiligo. *Clin. Exp. Dermatol.*, **28**(3): 285, 2003.

PEREIRA, M. S. N. **Remédios Caseiros**. Imprensa Universitária, Universidade Federal de Minas Gerais: Minas Gerais, Brasil, 1984.

PETTIT, G.R.; NUMATA, A.; TAKEMURA, T.; ODE, R.H.; NARULA, A.S.; SCHMIDT, J.M.; CRAGG, G.M.; PASE, C.P. Antineoplastic agents, 107. Isolation of acteoside and isoacteoside from *Castilleja linariaefolia*. *J. Nat. Prod.*, **53**(2): 456, 1990. Abstract.

PINHO, R.S.; OLIVEIRA, A.F.M.; SILVA, S.I. Potencial Oil Seed crops from the semiarid region of northeastern Brazil. *Bioresource Tech.*, **100**: 6114, 2009.

POOL, A.. A Review of the Genus *Pyrostegia* (Bignoniaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **95**: 495, 2008.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Formas farmacêuticas obtidas por dispersão molecular: Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 2.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1979.

PU, X.; SONG, Z.; LI, Y.; TU, P.; LI, H. Acteoside from *Cistanche salsa* inhibits apoptosis by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion in cerebellar granule neurons. *Planta Med.*, **69**(1): 65, 2003.

RAMAN, A.; LIN, Z.X.; SVIDERSKAYA, E.; KOWALSKA, D. Investigation of the affect of *Angelica sinensis* root extract on the proliferation of melanocytes in culture. *J. Ethnopharmacol.*, **54**(2-3): 165, 1996.

REYES, J.J.; BARRIOS, M. I.; HERRADA, C.G. Management of Vitiligo. *Actas Dermosifiliog.*, **817**: 217, 1996.

RODRIGUES, V. E. G.; DE CARVALHO, D. A. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: UFLA, p. 180, 2001.

ROELANDTS, R. Photo (chemo) therapy for vitiligo. *Photoimmunol. Photomed.*, **19**(1): 1, 2003.

SAMPAIO, S. A. P.; CASTRO, R. M.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia Básica**, 2 ed. São Paulo: Artes médicas, 2000.

SANTOS, C.; SILVA, B.C.D.; RIBEIRO, B.B.; DUARTE, M.C.T.; FREI, F. Atividade Antimicrobiana e letalidade contra *Artemia salina* dos extratos obtidos a partir de *Pyrostegia venusta*. 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2007. Resumo.

SANTOS, K. F. R.; OLIVEIRA, T. T; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; OLIVEIRA, M. G. A., Hypolipidaemic effects of neringenin, rutin, nicotinic acid and their associations. *Pharmacol. Res.*, **40**(6): 493, 1999.

SANTOS, M.D.; BLATT, C.T.T. Teor de flavonoides e fenois totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. da mata e de cerrado. *Rev. Bras. Bot.*, **21**(2): 135, 1998.

SATYAVATHI, M.; RADHAKRISHNAIAH, M.; NARAYANA, L. L. A note on the phytochemical constituents of some Bignoniaceae. *Curr. Sci.*, **53**: 711, 1984.

SCHALLREUTER, K.U.; MOORE, J.; WOOD, J.M. *In vivo* and *in vitro* evidence for hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) accumulation in the epidermis of patients with vitiligo and its successful removal by a UVB-activated pseudocatalase. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **4**: 91, 1999.

SCHALLREUTER, K.U. Controversies in Experimental Dermatology. *Exp. Dermatol.*, **17**: 139, 2008.

SCHAPOVAL, E.E.S.; DE VARGAS, M.R.W.; CHAVES, C.G.; BRIDI, R.; ZUANAZZI, J.A.; HENRIQUES, A.T. Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. *J. Ethnopharmacol.*, **60**: 53, 1998.

SCOGIN, R. Anthocyanins of the Bignoniaceae. *Biochem. Syst. and Ecol.*, **8**: 273, 1980.

SCUDELLER, V.V. Bignoniaceae Juss. no Parque Nacional da Serra da Canastra – Minas Gerais, Brasil. Iheringia, *Sér. Bot., Porto Alegre*, **59**(1): 59, 2004.

SENS, SL. **Alternativas para a auto-sustentabilidade dos Xokleng da terra indígena Ibirama**. p. 386. Dissertação de Mestrado, Programa Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

SHALBAF, M.; GIBBONS, N.C.J.; WOOD, J.M.; MAITLAND, D.J.; ROKOS, H.ELWARY, S.M.; MARLES, L.K.; SCHALLREUTER, K.U. Presence of epidermal allantoin further supports oxidative stress in vitiligo. *Exp. Dermatol.*, **17**: 761, 2008.

SHENG, G.; ZHANG, J.; PU, X.; MA, J.; Li, C. Protective effect of verbascoside on 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **451**: 119, 2002.

SOBERÓN, J.R.; SGARIGLIA, M.A.; SAMPIETRO, D.A.; QUIROGA, E.N.; VATTUONE, M.A. Free redical scavenging activities and inhibition of inflammatory enzymes of phenolics isolated from *Tripodantus acutifolius*. *J. Ethnopharm.*, **130** (2):329, 2010.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; DOLAN, J.W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3. ed. John wiley & Sons, Inc., 2010.

TADA, H.; SHIDO, O.; KUROSHIMA, K.; TSUKAMOTO, K. New improved colorimetric assay for intesleukin 2. *J. Immunol. Meth.*, **93**: 157, 1986.

TINOI J.; RAKARIYATHAM N.; DEMING R.L. Determination of Major Carotenoid Constituents in Petal Extracts of Eight Selected Flowering Plants in the North of Thailand. *Chiang Mai J. Sci.*; **33**(2): 327, 2006.

VASSILIKI, T.P.; TSIMIDOU, M.Z. Impact of sampling parameters on the radical scavenging potential of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *J. Agric. Food Chem.*, **57**: 3470, 2009.

VUKICS, V.; HEVESI, B.; FUKASZ, A.; KERY, A. Impact of flavonoid composition of medicinal plants: difficulties in selecting an LC method. *Chromatographia*, **63**, S125, 2006.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis**. 2. ed. New York: Springer, p. 56-59, 2001.

WONG, I.Y.F.; HE, Z.; HUANG, Y.; CHEN, Z. Antioxidative activities of phenylethanoid glycosides from *Ligustrum purpurascens*. *J. Agric. Food Chem.*, **49**: 3113, 2001.

YANG, H.J.; SONG, M.C.; BANG, M.H.; LEE, J.H.; CHUNG, I.S.; LEE, Y.H.; JEONG, T.S.; KWON, B.M.; KIM, S.H.; KIM, D.K.; PARK, M.H.; BAEK, N.I. Development of Biologically Active Compounds from Edible Plant Sources-XII. FlavonolGlycosides from *Trigonotis peduncularis* Benth and its hACAT1 inhibitory Activity. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**(1):98, 2005.